

Änderung der Stoffwechselaktivität von BaF3-Zellen durch die Expression von *BCR/ABL*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:	Ines Engelmann geb. am 21.11.1989 in Lutherstadt Wittenberg
angefertigt am / in:	Universitätsklinikum Leipzig Department Innere Medizin, Dermatologie und Neurologie Abteilung Hämatologie, Internistische Onkologie, Hämostaseologische Ambulanz
Betreuer:	PD Dr.med. habil. Thoralf Lange PhD Michael Cross

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.04.2015

1 Bibliografische Beschreibung

Engelmann, Ines

Änderung der Stoffwechselaktivität von BaF3-Zellen durch die Expression von *BCR/ABL*

Universität Leipzig, Dissertation

52 S., 70 Lit., 28 Abb., 4 Tab., 2 Anlagen

Referat:

Die vorliegende Arbeit handelt von einer *in vitro* Untersuchung der Stoffwechselveränderungen durch die Expression von *BCR/ABL* bei BaF3-Zellen, einer murinen, IL-3-abhängigen B-Zelllinie. Die Zellen wurden in nährstoffreichem Standard- und in durch Titrationsen ermitteltem nährstoffarmem Minimalmedium auf unterschiedliche Stoffwechselaktivität in Abhängigkeit von *BCR/ABL*-Expression untersucht sowie auf die zusätzliche Beeinflussbarkeit durch IL-3. Danach wurden vergleichend zwischen den 2 Zelllinien (BaF3 und BaF3-*BCR/ABL*) im Minimalmedium und im Standardmedium Metabolite wie Glukose, Laktat und Aminosäuren bestimmt, wobei BaF3-*BCR/ABL* sowohl mit als auch ohne IL-3 kultiviert wurde. Um den Einfluss von Nährstoffrestriktion auf die Therapie zu zeigen, wurden anschließend vergleichend in den beiden Medien die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib titriert.

Die Ergebnisse zeigen, dass BaF3-*BCR/ABL* einen Wachstumsvorteil im Minimalmedium hat, welcher im Standardmedium nicht vorliegt. Während die bereits bekannte Verstärkung der Glukoseaufnahme durch *BCR/ABL* im Standardmedium bestätigt wurde, konnte im Minimalmedium Gegenteiliges gezeigt werden. Zudem wurde ein Unterschied im Aminosäurestoffwechsel zwischen BaF3 + IL-3 und BaF3-*BCR/ABL* + IL-3 im Minimalmedium deutlich. Die therapeutische Relevanz des gezeigten Einflusses der Nährstoffrestriktion konnte anschließend in der Tyrosinkinaseinhibitortitration dargestellt werden, da die Medikamente in Abhängigkeit vom Medium unterschiedliche Wirkungen zeigen.

Insgesamt bieten die Ergebnisse einen metabolischen Erklärungsansatz für das Überleben von Tumorstammzellen in nährstoffarmen Arealen des Knochenmarks unter Therapie und Raum für neue Therapieansätze.

2 Abkürzungsverzeichnis

ABL	Englisch für: abelson murine leukemia viral oncogene
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	Englisch für: analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	Englisch für: breakpoint cluster region
CFU	Englisch für: colony forming Unit
CML	Chronische myeloische Leukämie
CRKL	Englisch für: Crk-like protein
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
DNA	Englisch für: deoxyribonucleic acid
ELN	Englisch für: European leukemia net
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FCS	Englisch für: fetal calf serum
GLUT-1	Glukosetransporter 1
GOD	Glukose-Oxidase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Grb2	Englisch für: growth factor receptor-bound protein 2
GSH	Glutathion
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	Englisch für: human leukocyte antigen
IL-3	Interleukin-3
JAK	Janus Kinase
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDH	Laktatdehydrogenase
NADH ₂	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH ₂	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
POD	Peroxidase
Raf	Englisch für: rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Englisch für: rat sarcoma

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium für Zellkultur
RT-PCR	Englisch für: reverse transcription polymerase chain reaction
STAT	Englisch für: signal transducers and activators of transcription
TGF	Englisch für: tumor growth factor

3 Inhaltsverzeichnis

1	Bibliografische Beschreibung	I
2	Abkürzungsverzeichnis	II
3	Inhaltsverzeichnis	IV
4	Einleitung	1
4.1	Hämatopoese	1
4.2	Knochenmarksnische	2
4.3	Chronische Myeloische Leukämie (CML)	3
4.3.1	Pathogenese	3
4.3.2	Epidemiologie und Verlauf	5
4.3.3	Therapie	6
4.4	BaF3 Zelllinie	8
4.5	Zellstoffwechsel	9
4.5.1	Allgemeines	9
4.5.2	Beeinflussung des Glukosestoffwechsels durch IL-3 und <i>BCR/ABL</i>	10
5	Aufgabenstellung	11
6	Materialien und Methoden	12
6.1	Materialien	12
6.1.1	Zelllinien	12
6.1.2	Medien für die Zellkultur	12
6.1.3	Chemikalien	15
6.1.4	Geräte und Gebrauchsmaterialien	16
6.2	Methoden	17
6.2.1	Methoden der Zellkultur	17
6.2.2	Biochemische Methoden	19
6.2.3	Auswertung der Daten	21
7	Ergebnisse	23
7.1	Definition des Minimalmedium	23
7.1.1	FCS-Titrationen	23
7.1.2	Glukosetitration	24
7.1.3	Glutamintitration über 0,5 mM	25
7.1.4	IL-3 Titration	26
7.1.5	Glutamintitration unter 0,5 mM	27

7.1.6	Zusammensetzung des Minimalmediums	28
7.2	Metabolitenbestimmung	29
7.2.1	Definition der Einsäzellzahl	29
7.2.2	Bestimmung des Glukoseverbrauchs	30
7.2.3	Bestimmung der Laktatproduktion.....	31
7.2.4	LC-MS/MS	32
7.2.5	Übersicht über Metabolitenveränderungen	34
7.3	Titration der Tyrosinkinaseinhibitoren	35
7.3.1	Imatinib	35
7.3.2	Nilotinib	36
8	Diskussion	38
8.1	Proliferation im Minimal- und im Standardmedium	38
8.2	Veränderungen der Glukoseaufnahme	39
8.3	Veränderung des Aminosäuremetabolismus	40
8.4	Tyrosinkinaseinhibitortitrationen	42
8.5	Ausblick.....	44
9	Zusammenfassung	45
10	Literaturverzeichnis.....	47
11	Anlagen	VI
12	Selbständigkeitserklärung	IX
13	Lebenslauf	X
14	Danksagung	XI

4 Einleitung

4.1 Hämatopoese

Hämatopoese bezeichnet die Bildung der Blutzellen. Alle Blutzellen bilden sich aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen¹.

Durch den Einfluss von verschiedenen Zytokinen, wie beispielsweise von Interleukinen, CSFs (Koloniestimulierende Faktoren), Erythropoetin und Thrombopoetin, differenzieren die multipotenten Stammzellen zu myeloischen und lymphoiden Vorläuferzellen. Während sich aus der lymphoiden Vorläuferzelle die verschiedenen Lymphozyten bilden, entwickeln sich aus den myeloischen Vorläuferzellen über verschiedene weitere Differenzierungsschritte Granulozyten, Monozyten, Erythrozyten und Thrombozyten² (siehe Abbildung 1).

Die verschiedenen zellulären Bestandteile des Blutes erfüllen verschiedene Aufgaben. Während die Erythrozyten vor allem für den Sauerstofftransport wichtig sind, stellen die Thrombozyten einen notwendigen Bestandteil der Blutgerinnung dar. Die Leukozyten sind für die Infektabwehr verantwortlich, wobei Granulozyten einen Teil der unspezifischen Abwehr darstellen, während B- und T-Lymphozyten auch für die spezifische Abwehr zuständig sind.

Um die natürlichen Verluste auszugleichen werden Blutzellen konstant in einem bestimmten Verhältnis zueinander gebildet. Unter verschiedenen Bedingungen kann unter dem Einfluss der Zytokine von diesem Verhältnis abgewichen werden. So werden beispielsweise bei Sauerstoffmangel vermehrt Erythrozyten und bei Infektionen verstärkt Lymphozyten und Granulozyten gebildet¹.

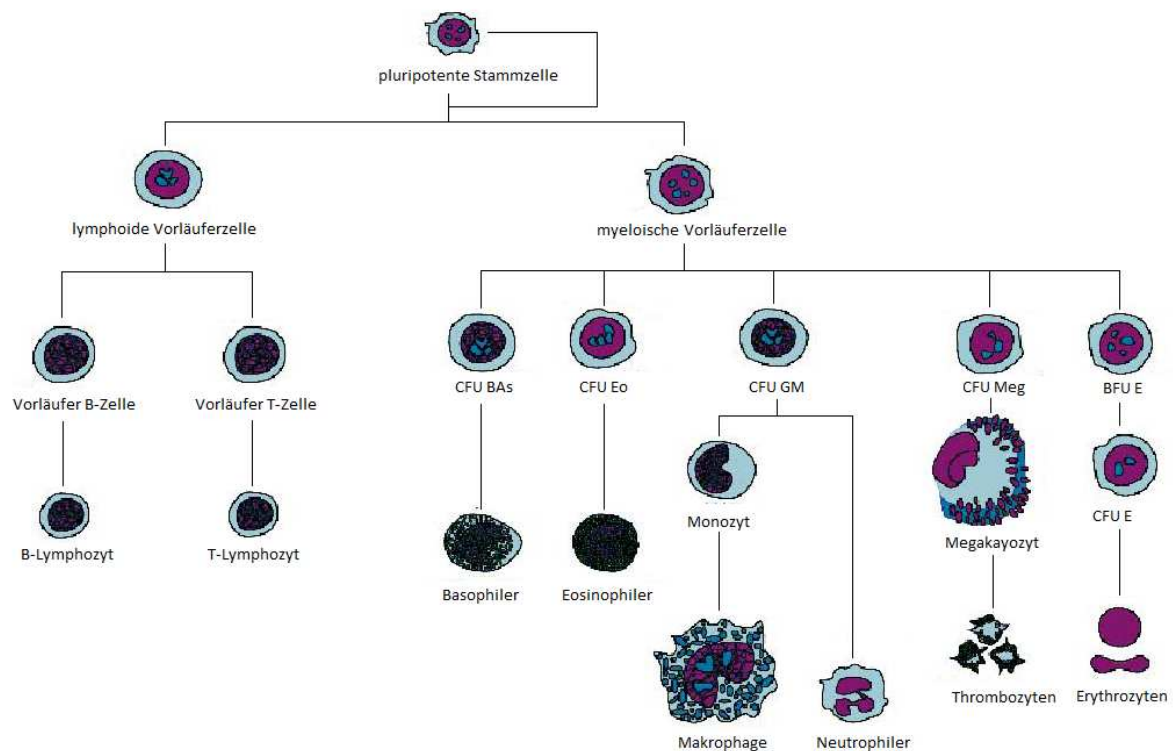


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Hämatopoese. Eigene Darstellung auf Basis von Gardner, 2006³ und Heinrich 2010⁴.

4.2 Knochenmarksnische

Für die Regulation der Blutbildung ist die Umwelt, in der die Stammzellen proliferieren, von entscheidender Bedeutung. Der Begriff der Stammzellnische wurde 1978 von Schofield geprägt⁵. Zu einer Stammzellnische gehören neben den Stammzellen selbst auch unterstützende Stromazellen, extrazelluläre Matrixproteine wie Integrine und Cadherine sowie die versorgenden Blutgefäße. Die Zusammensetzung einer bestimmten Nische ist abhängig von Art der Stammzelle und des Lebewesens⁶.

Ort der Blutbildung und somit die Stammzellnische für hämatopoetische Stammzellen ist beim erwachsenen Menschen das rote Knochenmark der spongiösen Knochen des Rumpfes und der Epiphysen der Röhrenknochen¹. Bisher konnte gezeigt werden, dass in der endostalen Nische Osteoblasten in der Regulation der Hämatopoese eine wichtige Rolle spielen⁷. Zudem existiert eine vaskuläre Nische, in der hämatopoetische Stammzellen vor allem mit sinusoidalen Endothelzellen assoziiert sind⁸. Des Weiteren wurden verschiedene extrazelluläre Fakto-

ren definiert, die für die hämatopoetischen Stammzellen eine entscheidende Bedeutung haben, wie wnt/ β -catenin, TGF- β , Notch oder Hedgehog⁹.

Als Einflussfaktor auf metabolischer Ebene ist vor allem die Hypoxie in der Knochenmarksnische beschrieben¹⁰. Somit spielt HIF-1 α eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellmetabolismus. Hämatopoetische Stammzellen nutzen aufgrund der hypoxischen Verhältnisse und um die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während der oxidativen Phosphorylierung zu vermeiden, vorwiegend die anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung. Insgesamt ist in Abhängigkeit vom Abstand zu den versorgenden Arterien in vielen Teilen des Knochenmarks nicht nur von einer sauerstoff- sondern auch einer nährstoffarmen Umgebung auszugehen¹¹.

4.3 Chronische Myeloische Leukämie (CML)

4.3.1 Pathogenese

Die chronische myeloische Leukämie ist eine myeloproliferative Erkrankung.

Die klassische CML ist durch das Vorhandensein des Philadelphia-Chromosoms charakterisiert, einer reziproken Translokation von Chromosom 9 und 22 [t(9;22)]. Dabei entsteht ein Fusionsgen aus dem auf Chromosom 22 gelegenen Tyrosinkinasegen *c-ABL* und der Breakpoint Cluster Region des Chromosoms 9. Das aus dieser Translokation resultierende Gen wird als *BCR/ABL* bezeichnet^{12,13,14,15,16}.

Zu Beginn der Erkrankung kommt es in einer hämatopoetischen Stammzelle durch die Translokation zur Entstehung des Philadelphia-Chromosoms. Während die Pathogenese der Erkrankung gut verstanden ist, sind die Mechanismen, die zu dieser Chromosomenmutation führen, weitestgehend unklar¹⁷. Es kommt nur zur Erkrankung, wenn die Translokation in einer hämatopoetischen Stammzelle auftritt, da sie so durch das hohe Zellteilungspotential der Zellen lange überleben und an viele Tochterzellen weitergegeben werden kann.

Das Protoonkogen *c-ABL* ist eine Tyrosinkinase, welche in vielen Zellen exprimiert wird. Sie befindet sich in normalen Zellen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma. Im Zytoplasma überträgt *c-ABL* Signale von Rezeptoren der Zelloberfläche zur Regulation der Struktur des Zytoskeletts¹⁸. Im Zellkern reguliert *c-ABL* die Transkription und die Apoptose¹⁹. Der Bruchpunkt des *c-ABL* Gens liegt am 5' Ende variabel vor, hinter oder zwischen den Exons 1a und 1b²⁰.

Es gibt verschiedene Punkte, an denen das *BCR*-Gen brechen kann. Die Mehrzahl der *BCR*-Gene bricht in der 5.8 kb Region zwischen Exon 12-16, welche auch als „major breakpoint cluster region“ (M-bcr) bezeichnet wird. Bricht das *BCR*-Gen an dieser Stelle, resultiert daraus das p210 Fusionsprotein, welches bei ca. 95 % der CML Patienten vorliegt. Eine weitere Bruchregion, bezeichnet als „minor breakpoint cluster region“ (m-bcr), liegt zwischen den Exons e1 und e2 des *BCR*-Gens. In diesem Fall entsteht ein kleineres 190 kD *BCR-ABL*-Fusionsprotein (p190), welches vorrangig bei der B-Zell positiven akuten lymphatischen Leukämie zu finden ist. Die dritte Bruchregion μ -bcr liegt zwischen den Exons e19 und e20 und führt zu einem p230 Fusionsprotein²⁰.

Durch die Translokation wird die Tyrosinkinase c-ABL dauerhaft und weitere Signaltransduktionsproteine wie STAT²¹, PI3-Kinase^{22,23} und Ras²⁴ konsekutiv aktiviert, dargestellt in Abbildung 2. Die Aktivierung der Proteine erfolgt durch das Übertragen eines Phosphatrestes auf das Zielprotein. Dieser Phosphatrest wird zuvor von der energiereichen Verbindung ATP abgespalten. Insgesamt führt die Daueraktivität von c-ABL über die Verstärkung mitogener Signale und über die verminderte Empfänglichkeit für Apoptosesignale zu einer wachstumsfaktorunabhängigen Proliferation²⁵.

Das Fusionsprotein p210 ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Somit kann c-Abl seine nukleäre pro-apoptotische Wirkung nicht entfalten, sodass die anti-apoptotische Wirkung durch die Aktivierung der Signaltransduktionswege im Zytoplasma überwiegt.

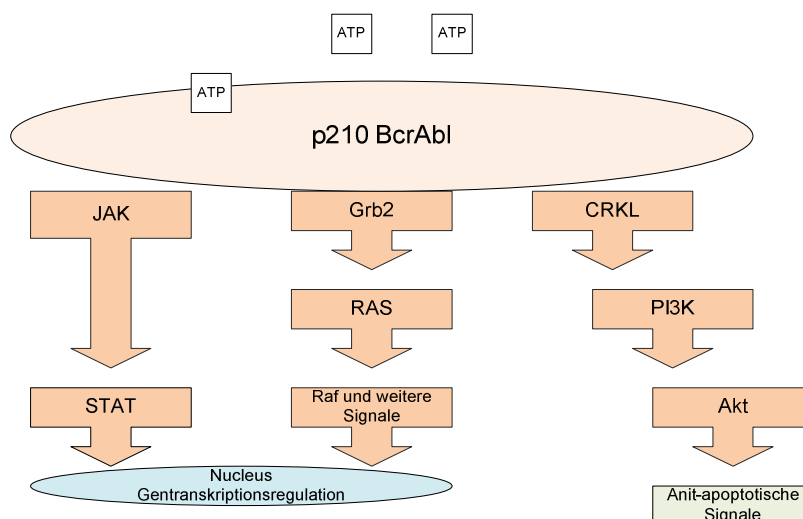


Abbildung 2: *BCR/ABL* aktiviert verschiedene zelluläre Signalwege^{25,26}

4.3.2 Epidemiologie und Verlauf

In Deutschland erkranken jährlich etwa 1200 Patienten an einer CML, wobei die Mortalität unter der aktuellen Therapie auf 1,5 %/Jahr gesenkt werden konnte²⁷.

Bei der Erkrankung werden drei Phasen beobachtet.

In der frühen chronischen Phase sind die Patienten oft asymptomatisch. Die Krankheit kann hauptsächlich an einer Splenomegalie und einer Leukozytose mit Basophilie und unreifen Granulozyten erkannt werden. Dazu können Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Leistungsminderung und Nachtschweiß auftreten. Die Diagnose muss zytogenetisch mit dem Nachweis der Translokation (9;22) und durch den Nachweis von BCR-ABL-Transkripten mittels RT-PCR bestätigt werden²⁸.

Die Dauer der verschiedenen Phasen ist sehr variabel. Die chronische Phase dauert unbehandelt durchschnittlich 4-6 Jahre. Während der chronischen Phase breiten sich, ausgehend von einer mutierten Tumorstammzelle die Zellen mit dem *BCR/ABL*-Fusionsgen mehr und mehr im Knochenmark aus²⁹.

Es folgt die Akzelerationsphase. Sie ist nach Richtlinien des European leukemia net (ELN) durch das Auftreten von 15-29 % myeloischen Blasten in Blut und Knochenmark, Blasten und Promyelozyten von über 30 % (wobei die Blasten allein < 30 % darstellen) bzw. durch eine verstärkte Basophilie von über 20 %, einer Thrombozytopenie (< 100x10⁹/L) oder von klonalen, chromosomalen Abnormalitäten der *BCR/ABL*-positiven Zellen gekennzeichnet³⁰. Molekularbiologisch ist die Progression von der chronischen zur Akzelerationsphase noch nicht vollständig verstanden. Zusätzliche zytogenetisch nachweisbare Chromosomenänderungen oder Mutationen durch die genetische Instabilität aufgrund des Philadelphia-Chromosoms könnten ein Auslöser sein³¹.

Unbehandelt endet jede CML in einer Blastenkrise. Man definiert sie nach ELN mit einem Anstieg der Blasten auf > 30 % im Blut oder im Knochenmark oder mit dem Auftreten von extramedullären Blasteninfiltraten³⁰. Der Krankheitsverlauf in der Blastenkrise ist ähnlich dem einer akuten Leukämie und kann schnell zum Tod führen³².

4.3.3 Therapie

Die einzige heilende Therapie der CML ist die Stammzelltransplantation, diese ist jedoch mit erheblichen Risiken für den Patienten verbunden.

Die Entdeckung von Medikamenten wie Imatinib, welche die Aktivität der dauerhaft aktivierten Tyrosinkinase c-ABL hemmen, bedeutete einen Durchbruch in der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie. Im November 2001 wurde Imatinib als Tyrosinkinaseinhibitor der ersten Generation auf dem europäischen Markt zugelassen³³. Dieser Inhibitor der ersten Generation hemmt die Enzymaktivität, indem die ATP-Bindungsstelle der Kinase blockiert wird³⁴, sodass kein Phosphatrest auf andere Proteine übertragen werden kann und die Aktivierung dieser Proteine ausbleibt (siehe Abbildung 3). Die Tyrosinkinaseinhibitoren wirken unterschiedlich auf die verschiedenen Tyrosinkinasen. Imatinib ist ein besonders potenter Inhibitor der Abl-Kinase, hemmt jedoch auch andere Tyrosinkinasen wie c-kit und PDGFRA^{35,36}. Ein Nichtansprechen auf Imatinib, was in der Akzelerationsphase und der Blastenkrise besonders häufig ist, kann mit Punktmutationen im *BCR/ABL*-Gen assoziiert sein³⁷.

Zunächst wurden für Imatinib-resistente Patienten Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten und dritten Generation entwickelt, wie Dasatinib und das 2003 zugelassene Nilotinib³³. Nilotinib zeigt durch eine Veränderung der N-Methylpiperazingruppe³⁸ im Gegensatz zu Imatinib eine mindestens 10-fach höhere Affinität zu *BCR/ABL* und wirkt auch gegen Imatinib-resistente Mutationen³⁹.

Die mittlere Plasmakonzentration von Nilotinib bei der Einnahme von 400 mg zweimal täglich (Dosisempfehlung bei Resistenz gegen Imatinib) liegt bei ca. 1,7 μM ⁴⁰. Die Konzentration von Imatinib bei der Einnahme von 400 mg täglich (Dosisempfehlung in der chronischen Phase) liegt im Mittel bei ca. 979 ng/ml (ca. 2 μM)⁴¹. Dabei scheinen Imatinibplasmaspiegel von über 1000 ng/l ein wichtiger Faktor für das Erreichen der kompletten zytologischen Remission zu sein⁴².

Als Erstlinien-Therapie in der chronischen Phase werden heute Imatinib oder einer der beiden Tyrosinkinaseinhibitoren der zweiten Generation Nilotinib und Dasatinib verwendet. Die Entscheidung zwischen den drei Medikamenten sollte in Zusammenschau von weiteren Vorerkrankungen des Patienten, der Erfahrung des behandelnden Arztes sowie den Therapiekosten abgeleitet werden. Bei Versagen der Standardtherapie kann von Imatinib auf ein Medikament der zweiten Generation gewechselt werden. Sollte von vornherein mit Dasatinib oder Nilotinib behandelt worden sein, muss die Therapie auf das andere Medikament der zweiten Generation oder Ponatinib als Tyrosinkinaseinhibitor der dritten Generation umgestellt werden³⁰.

Im Fall eines Therapieversagens der Tyrosinkinaseinhibitoren, bei speziellen HLA-Konstellationen sowie einer Diagnose in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium sollte frühzeitig die Indikation zur Stammzelltransplantation überprüft werden³⁰.

Trotz der hohen Effektivität der Therapie kann die CML mit Tyrosinkinaseinhibitoren nicht geheilt werden. Das liegt unter anderem an verbleibenden Tumorstammzellen im Körper, welche in einem ruhenden Zustand nicht sensitiv auf Imatinib sind⁴³ und auch nicht durch die Inhibitoren der zweiten Generation vollständig eradiziert werden können. Weitere Probleme der Behandlung sind das Fortschreiten der Erkrankung unter Therapie und die Resistenzentwicklung auf Tyrosinkinaseinhibitoren beispielsweise durch Punktmutationen.

Neuere Therapieansätze versuchen deswegen zusätzlich die inaktiven *BCR/ABL*-positiven Zellen zu eliminieren. Dies wird unter anderem durch die Kombinationstherapie von Tyrosinkinaseinhibitoren mit Interferon- α erreicht⁴⁴.

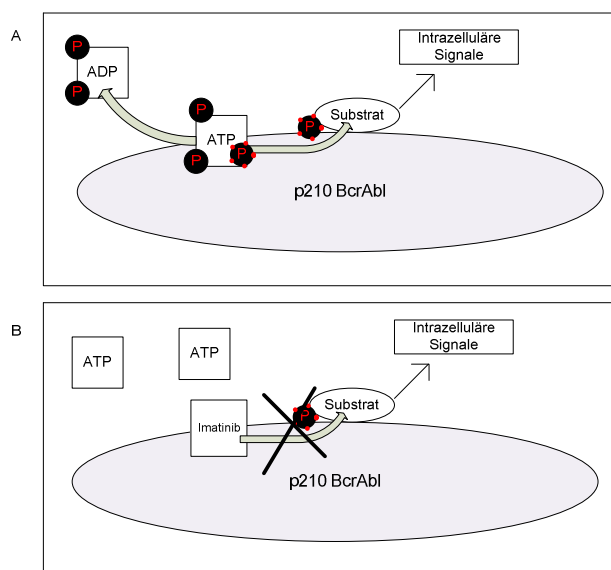


Abbildung 3: Wirkmechanismus von Imatinib

A *BCR/ABL* überträgt einen Phosphatrest von ATP auf ein Substrat, welches so aktiviert wird und intrazelluläre Signalkaskaden auslöst.

B Imatinib blockiert die ATP Bindungsstelle. Somit kann das Substrat nicht phosphoryliert werden und die intrazellulären Signalkaskaden können nicht ablaufen.

Die Identifizierung neuer Therapieoptionen und die Verbesserung der Wirksamkeit der bestehenden Therapien ist oberstes Ziel bei der Behandlung der CML. Hierfür muss nicht nur die genomische Ebene sondern auch die Interaktion des Zellmetabolismus mit genetischen Veränderungen und Medikamenten untersucht werden. Durch metabolische Veränderungen in der Stammzellnische könnte die Empfindlichkeit der Tumorstammzellen gegen Tyrosinkinaseinhibitoren gesteigert werden. Dieser Aspekt der Therapieverbesserung wurde in dieser Arbeit in einem CML Kulturmodell mit BaF3-Zellen und Medien mit verschiedenem Nährstoffgehalt getestet.

4.4 BaF3 Zelllinie

Für die Experimente wurden BaF3-Zellen genutzt, eine Interleukin-3 (IL-3) abhängige, murine pro-B-Zell Linie, die erstmals 1985 von Palacios und Steinmetz beschrieben wurde⁴⁵. Drei Jahre später gelang es Daley und Baltimore, die Linie durch Retroviren mit *BCR/ABL* zu transfizieren⁴⁶. Durch die Transfektion konnten die Zellen IL-3 unabhängig proliferieren, somit konnte bei diesen Experimenten das onkogene Potential der p210-Variante von *BCR/ABL* auf hämatopoetische Zelllinien gezeigt werden. Heute gibt es diverse Transfektionskits, mit denen verschiedenste Mutationen in die Zellen eingebracht werden können. So werden BaF3-Zellen nicht nur für die Erforschung hämatopoetischer Neoplasien genutzt. Durch das Einbringen von beispielsweise EGFR oder Her2 können sie auch als Modellsystem für die Erforschung von anderen Neoplasien, wie Lungen-⁴⁷ oder Brustkrebs⁴⁸ genutzt werden.

IL-3 ist ein Wachstumsfaktor für einige hämatopoetische Zellen zum Beispiel. Mastzellen, Eosinophile und Basophile. Der IL-3-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Untereinheit, die bei IL-3-Bindung dimerisieren. Dadurch werden Signalwege wie JAK2/STAT5, die Ras-Kinase oder PI3K aktiviert⁴⁹. Sowohl IL-3 als auch *BCR/ABL* nutzen Cyclin D2 und p27^{Kip1} als Mediator für ihre proliferationsfördernde Wirkung⁵⁰. Insgesamt lösen *BCR/ABL* und IL-3 ähnliche zelluläre Signalwege aus.

Da BaF3-Zellen in Suspension schnelles Wachstum zeigen und ein relativ leichtes Einbringen von Genen durch retrovirale Systeme oder Elektroporation ermöglichen, ist die Zelllinie ein beliebtes Modell für die Erforschung von *BCR/ABL*, Tyrosinkinaseinhibitoren und neu auftretenden Kinasemutationen⁵¹. So wurden sie beispielsweise genutzt, um die höhere Potenz von Nilotinib, einem Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation, zu zeigen³⁹. Außerdem wur-

de die Zelllinie mehrfach eingesetzt, um Mutationen im *BCR/ABL*-Gen zu identifizieren, die zu Imatinibresistenz oder zu Resistenzen gegen Nilotinib und Dasatinib führen^{52,53}.

4.5 Zellstoffwechsel

4.5.1 Allgemeines

An dieser Stelle soll nur kurz auf einige für die Arbeit relevante Teile des Stoffwechsels eingegangen werden.

Ihre Energie, hauptsächlich in Form von ATP, kann eine Zelle aus dem Abbau von Glukose, Fettsäuren oder Aminosäuren gewinnen. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat abgebaut. Wenn wenig oder kein Sauerstoff vorhanden ist, kann Pyruvat durch die Laktatdehydrogenase zu Laktat umgesetzt werden (anaerobe Glykolyse). Ist genug Sauerstoff vorhanden, wird Pyruvat vornehmlich durch die Pyruvatdehydrogenase zu Acetyl-CoA verarbeitet, welches in den Zitratzyklus eingespeist werden kann. Die im Zitratzyklus entstehenden Reduktionsäquivalenten NADH_2 und FADH_2 können dann in der Atmungskette mit Hilfe von Sauerstoff weiter zur Energiegewinnung genutzt werden (aerobe Glykolyse).

In der β -Oxidation werden Fettsäuren zu Acetyl-CoA abgebaut, welches ebenso in den Zitratzyklus zur weiteren Energiegewinnung eingespeist werden kann.

Auch aus dem Abbau von Proteinen bzw. Aminosäuren kann Energie gewonnen werden. Wenn Aminosäuren abgebaut werden, muss der überflüssige Stickstoff durch den Harnstoffzyklus als Harnstoff ausgeschieden werden.

Aminosäuren spielen jedoch vor allem im anabolen Stoffwechsel als Grundbestandteil der Proteine und somit beispielsweise als Grundbestandteil der Enzyme, Transportproteine und Rezeptormoleküle eine große Rolle. Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin sind essentielle Aminosäuren, die aufgenommen werden müssen und vom menschlichen Körper nicht aus anderen Substanzen synthetisiert werden können.

Auch Glukose und Fettsäuren sind für den anabolen Strukturstoffwechsel von Zellen wichtig. Während Lipide beispielsweise die Zellmembran bilden, ist das im Pentosephosphatweg aus Glukose entstehende Ribose-5-Phosphat ein wichtiger Bestandteil der Purinbiosynthese und somit der DNA⁴.

Welche Prozesse für die jeweiligen Zellen im Vordergrund stehen, hängt von Art und Funktion der Zelle, dem Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen und von ihrer metabolischen Umgebung ab.

4.5.2 Beeinflussung des Glukosestoffwechsels durch IL-3 und *BCR/ABL*

BCR/ABL sowie IL-3 steigern, vermittelt über die PI3K und der nachgeordneten Akt-Kinase, die Aufnahme von Glukose. Die erhöhte Glukoseaufnahme ist mit dem vermehrten Einbau von GLUT-1-Transportern in die Zellmembran assoziiert und wichtig für die Suppression der Apoptose. Durch Inhibierung des Glukosetransportes kann diese Unterdrückung des programmierten Zelltods rückgängig gemacht werden. Die aus der reduzierten Glukosekonzentration resultierende Apoptose kann jedoch zumindest teilweise durch die Bereitstellung anderer Energiequellen wie Glutamin oder Pyruvat verhindert werden^{54,55,56}.

Bei einer Behandlung mit Imatinib reagieren *BCR/ABL*-exprimierende Zellen mit einem dramatischen Abfall der Glukoseaufnahme und einer Internalisierung der Glukosetransporter. Dieser Mechanismus scheint eine wesentliche Rolle in der Wirkung von Imatinib zu spielen⁵⁷. Weiterhin ist bei sensitiven Zellen unter Imatinibtherapie eine Inhibierung der aeroben Glykolyse zu sehen, während resistente *BCR/ABL*-Mutanten teilweise sogar eine erhöhte glykolytische Aktivität zeigen. Prinzipiell könnte so auch ein Monitoring der Glukosestoffwechselwege für die Überwachung des Ansprechens auf Imatinib in Betracht gezogen werden⁵⁸.

Über das Tumorsuppressorgen p53 besteht ein Zusammenhang zwischen der Zellteilung und dem Glukosestoffwechsel einer Zelle. Der gesteigerte Glukosemetabolismus in Krebszellen kann die C δ (PKC δ)-abhängige Aktivierung von p53 unterdrücken, wodurch die Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren proliferieren können. Die Hemmung des Glukosestoffwechsels durch Imatinib führt zu einer geringeren glykolytischen Aktivität und zum p53 abhängigen Zelltod⁵⁹.

Zudem haben bei Hypoxie und vermindertem Glukoseangebot *BCR/ABL*-Protein negative Zellen, welche die Tumorstammzellen repräsentieren könnten, einen Überlebensvorteil bei einer Therapie mit Imatinib⁶⁰.

In den letzten Jahren ist der Metabolismus von Krebszellen und dessen Einfluss auf das unkontrollierte Wachstum wieder in den Fokus der Forschung geraten. Dabei wird zum einen nach weiteren Erklärungsansätzen der Krebsentstehung, aber auch nach neuen Zielstrukturen für die Therapie von Krebserkrankungen gesucht.

5 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war es, *in vitro* die Hypothese zu prüfen, dass die Expression von *BCR/ABL* die Nährstoffabhängigkeit und den Metabolismus von BaF3-Zellen ändert.

Zellen mit der *BCR/ABL*-Translokation haben in der chronischen Phase in der Stammzellnische einen Wachstumsvorteil gegenüber *BCR/ABL*-negativen Zellen. Um zu untersuchen, wie *BCR/ABL* den Stoffwechsel und die Nährstoffabhängigkeit der Zellen beeinflusst und wie sich diese Beeinflussung auf das Überleben der Zellen auswirkt, wurden folgende Experimente durchgeführt:

1. Zuerst sollten in Zeitreihenversuchen die Mediumbestandteile FCS, Glukose und Glutamin titriert werden, um die minimalen Nährstoffbedingungen zu charakterisieren, unter denen sowohl die *BCR/ABL*-positiven als auch negativen Zellen noch wachsen. Dadurch sollte ein Minimalmedium definiert werden, welches als Grundlage für weitere Experimente diene.
2. Vergleichend zwischen dem Minimalmedium und dem nährstoffreichen Standardmedium sollte der Verbrauch der Metabolite bestimmt werden, um Unterschiede im Metabolismus darstellen zu können.
3. Zur Überprüfung ob die Unterschiede im Stoffwechsel eine therapeutische Relevanz haben und für die Therapieoptimierung genutzt werden können, sollten die Tyrosinkinaseinhibitoren Imatinib und Nilotinib im Minimalmedium und im Standardmedium titriert werden, um deren antiproliferativen Effekt unter verschiedenen Nährstoffbedingungen zu untersuchen.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Zelllinien

Für die *in vitro* Experimente wurden BaF3-Zellen ohne *BCR/ABL*-Fusionsgen (im weiteren bezeichnet als BaF3 + IL-3) und BaF3-Zellen, die mit dem *BCR/ABL*-Fusionsgen transfiziert wurden (im weiteren bezeichnet als BaF3-*BCR/ABL*), verwendet.

Zudem wurden BaF3-*BCR/ABL* je mit (+) und ohne (w/o) IL-3 kultiviert, um einen eventuell zusätzlichen Einfluss des Wachstumsfaktors IL-3 auf das Wachstum und den Stoffwechsel ausmachen zu können.

Es folgen daraus zwei verwendete Zelllinien und insgesamt drei betrachtete Bedingungen:

- BaF3 + IL-3
- BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3
- BaF3-*BCR/ABL* + IL-3.

Die BaF3-Zelllinie war im Labor bereits vorhanden. Für den Erhalt einer *BCR/ABL*-Linie wurden die BaF3 von S-Y. Wang transfiziert. Dabei wurde der vollständige Leserahmen des *BCR/ABL*-Fusionsgens⁶¹ mit dem RVK-10001-Retroviral Expression System Kit mittels Retroviren in die BaF3-Zellen eingebracht.

6.1.2 Medien für die Zellkultur

Das Standardkulturmedium für die BaF3-Zellen ist RPMI 1640 der Firma Biochrom, versetzt mit 10 % FCS (PAN) und 2 mM Glutamin. Für die Kultivierung von BaF3 und BaF3-*BCR/ABL* +IL-3 wurde zudem noch 10 % IL-3 konditioniertes Medium, hergestellt durch die murine myelome Zelllinie X63AG8.653⁶², hinzugefügt.

In den Versuchen wurden einzelne Mediumbestandteile wie FCS, Glutamin und Glukose titriert. Dafür wurde ein selbst hergestelltes Grundmedium verwendet (RPMI-SM), welches auf der Zusammensetzung des RPMI 1640 der Firma Biochrom basiert. Die Zusammensetzung des selbst hergestellten Mediums kann Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Zusammensetzung RPMI

	Konzentration in RPMI-SM in mg/l	Hersteller/ Artikelnummer	Konzentration in RPMI Biochrome in mg/l
Salze			
NaCl	8006,28	Gibco 14200-067	8000
KCl D-PBS	201,31		400
KH ₂ PO ₄ 10x	204,00		-
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	2170,80		1512
MgSO ₄ ·7H ₂ O	48,99	Sigma M-2643	100
CaCl ₂ ·2H ₂ O	99,97	Sigma C-7902	-
NaHCO ₃ (Sodiumbicarbonat)	2002	Gibco 25080-060	2000
Ca(NO ₃)·4H ₂ O	-	-	100
Vitamine			
Vit. B1-Thiamin	1,01	Sigma T-1270	1
Vit. B2-Riboflavin	0,20	Sigma R-9504	0,05
Vit. B3-Nikotinamid	0,98	Sigma N-0636	1
Vit. B5-D-Ca-Pantothenat	0,24	Sigma P-5155	0,25
Vit. B6-Pyridoxin	1,03	Sigma P-8666	1
Vit. B7-Biotin	0,20	Sigma B-4639	0,2
Vit. B9-Folsäure	0,97	Sigma F-8758	1
Vit. B12-Cobalamin	0,01	Sigma V-6629	0,005
Cholinchlorid	2,93	Sigma C-7527	3
Aminosäuren			
L-Alanin	300,23	Sigma A-7469	-
L-Serin	29,95	Sigma S-4311	30
L-Prolin	19,92	Sigma P-5607	20
L-Asparagin-H ₂ O	50,00	Merck 1.01566	20
L-Asparaginsäure	20,03	Sigma A-6558	50
L-Glutaminsäure	20,01	Sigma G-1501	20
Glycin	9,98	Sigma G-8790	10
L-Histidin	15,05	Sigma H-6034	15

L-Isoleucin	49,98	Sigma I-7268	50
L-Leucin	49,98	Sigma L-5652	50
L-Lysin	40,00	Fluka 62930	40
L-Methionin	14,92	Sigma M-5308	15
L-Phenylalanin	15,03	Sigma P-8324	15
L-Cystin	64,88	Sigma C-7602	64
L-Arginin	200,33	Fluka 11009	200
L-Threonin	20,01	Sigma T-8534	20
L-Tryptophan	4,90	Fluka 93659	5
L-Tyrosin	28,99	Fluka 93829	20
L-Valin	19,92	Sigma V-0258	20
L-Glutamin	-	-	300
L-Hydroxyprolin	-	-	20
Andere Komponenten			
Myo-Inositol	34,95	Sigma I-7508	35
Glutathion red.	0,92	Sigma G-6013	1
HEPES	1405	Sigma H-4034	-
Phenolrot	5	Sigma P-6290	5
p-Aminobenzoesäure	-	-	1
D-Glukose	-	-	200

Zu Beginn der Titrations der Metabolite wurden dem hergestellten RPMI-SM 5 mM Glukose, 2 mM Glutamin, 10 % FCS und je nach Zelllinie 10 U/ml murines rekombinantes IL-3 hinzugefügt. In den Titrations der einzelnen Metabolite variierte dann jeweils die Menge des zu titrierenden Stoffes. Als Minimalmenge eines Metaboliten wurde die niedrigste Konzentration definiert, bei der alle Zelllinien ein deutliches Wachstum zeigten. Nachfolgende Titrations und Versuche wurden mit der zuvor festgelegten Minimalkonzentration vorher untersuchter Metabolite durchgeführt. So wurde sich Schritt für Schritt dem endgültigen Minimalmedium angenähert.

6.1.3 Chemikalien

Neben den für die Herstellung des RPMI Mediums genutzten Chemikalien wurden außerdem folgende Stoffe verwendet:

Tabelle 2: Chemikalien

Stoffname	Hersteller	Artikelnummer
Acetat	Applichem	A 3686
ADP	Fluka	01897
Agarose	Sigma-Aldrich	A9539
D ⁺ -Glukose	Sigma-Aldrich	G7021
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	D 2650
EDTA	Applichem	A 5097
FCS	PAN	3302 – P261109
Glucose Liquicolor Kit	Human Diagnostics	10260
Glutamat-Dehydrogenase	Roche	10197734001
Glutamat-Pyruvat Transaminase	Roche	10105589001
Glutaminase	Sigma-Aldrich	G 8540
Hydrazin	Sigma-Aldrich	207942
IL-3 (rekombinant)	Cell Systems	CS-C2018
Imatinib	Novartis	
L -Glutamin	Sigma Aldrich	G8540
L-Glutamat	Sigma-Aldrich	41501
L-Laktat-Dehydrogenase	Roche	10127230001
NAD	Applichem	A11243
Natriumchlorid	Applichem	A2942
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	S5881
Nilotinib	Novartis	S0089
Osmometerstandard	Gonotec	30.9.0020
RPMI 1640 Flüssigmedium	Biochrome	F1215
Salzsäure	J.T. Baker	4097
TRIS	Applichem	A2264
Trypanblau	Biochrome	L 6323

6.1.4 Geräte und Gebrauchsmaterialien

Nachfolgend wurden alle verwendeten Geräte erfasst:

Tabelle 3: Übersicht Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Autoklav	Tuttnauer	5050 ELV
Brutschrank	Heraeus	Hera Cell 150
Mikroskop	Zeiss	Axio Vert A1
Kryo-Osmometer	Gonotec	Osmomat 030
pH-Meter	Hanna	H1223 Calibration check Microprocessor
Photometer	Implen	Nanophotometer 1206
Plattenreader	Tecan	sunrise
Sterilbank	Heraeus	Hera Save HS 12
	Bleymehl	ASW-UP IV
Vortexer	Scientific Industries	Vortex Gene 2
Waage	Sartorius	M-Power AZ 124
Zentrifugen	Heraeus	Biofuge pico
	Hettich	Universal 16
	Thermo	Megafuge 40 R

Handelsübliche Plasteware für die Zellkultur (Plastepipetten und Pipettenspitzen, Sterilfilter, Kulturplatten, Kulturflaschen, Falcons) wurden von GE Healthcare (ehemals Greiner BioOne) bezogen.

6.2 Methoden

6.2.1 Methoden der Zellkultur

6.2.1.1 *Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer*

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen manuell mit Neubauer Zählkammern gezählt. Zum Zählen wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Lebende Zellen nehmen diesen Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht auf und bleiben farblos, tote Zellen haben dagegen eine geschädigte, für den Farbstoff permeable Zellmembran und färben sich blau an. Die Zählkammer besteht aus einem Objektträger, auf dem zwei Zählnetze mit jeweils neun Großquadraten eingeschliffen sind und einem Deckgläschen, welches genau in einem Abstand von 0,1 mm zum Objektträger gehalten wird. Ein Großquadrat ist für die bessere Übersichtlichkeit in 16 Kleinquadrate eingeteilt. Die Großquadrate haben jeweils eine Kantenlänge von 1 mm, sodass ein Quadrat ein Kammervolumen von $0,1 \text{ mm}^3$ bzw. $0,1 \text{ ml}$ darstellt.

Die Zahl der gezählten Großquadrate wurde der Zelldichte angepasst. Es wurden keine weiteren Quadrate gezählt, wenn nach 3 Großquadraten über 100 Zellen (entspricht $6,6 \times 10^5/\text{ml}$) oder nach 5 Großquadraten über 50 Zellen (entspricht $2 \times 10^5/\text{ml}$) gezählt wurden. Ansonsten wurden alle 9 Großquadrate gezählt.

Die tatsächliche Zellzahl ergibt sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{gezählte Großquadrate}} \times \text{Kammervolumen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

6.2.1.2 *Erhaltungskultur der BaF3-Zelllinien*

Die Zellen wurden für die Erhaltungskulturen im Standardkulturmedium (RPMI Biochrome, 2 mM Glutamin, 10 % FCS, je nach Bedingung 10 % IL-3 cm) im Brutschrank bei Raumluft mit einer CO_2 -Konzentration von 5 % und bei einer Temperatur von 37°C kultiviert. Sie wurden alle 2-3 Tage gezählt und unter Zugabe von frischem Medium auf eine Zellzahl von $5 \times 10^4/\text{ml}$ in 10 ml in einer T25 Kulturflasche zurückverdünnt.

6.2.1.3 Titration einzelner Metabolite zur Bestimmung des Minimalmediums

Für die Titration der einzelnen Metabolite wurde RPMI-SM als Basis verwendet (siehe oben Medien für die Zellkultur). Die speziellen Medien wurden für jeden Versuch frisch hergestellt. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Flachbodenplatte à 100 µl kultiviert. Für den Versuchsansatz wurden die benötigten Zellmengen aus den Erhaltungskulturen entnommen und jeweils zwei Mal gewaschen (Zentrifugation bei 300 g für 5 min, Abnahme des Überstandes, Resuspendierung des Zellpellets in RPMI-SM ohne weitere Zusätze). Nach der dritten Zentrifugation wurden die Zellen in 400 µl RPMI-SM resuspendiert, gezählt und in der Zelldichte von 6×10^4 /ml in 96-Well-Platten ausgesäht, wobei jedes Well mit dem dazugehörigen ergänzten Medium auf 100 µl aufgefüllt wurde. Die Kulturen wurden über 8 Tage alle 2 Tage gezählt und anschließend im entsprechenden Medium auf 6×10^4 /ml zurückverdünnt. Aus den Zellzahlen ergaben sich wie folgt berechnet die Expansionen:

$$\text{Expansion} = \frac{\text{Zellzahl von Tag } x}{\text{Einsäzellzahl Tag } (x - 1)} \times \text{Expansionsfaktor Tag } (x - 1)$$

Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mit Ausnahme der IL-3-Titration je einmal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

6.2.1.4 Kultivierung für Metabolitenbestimmung und LC-MS/MS

Um die Zellen besser metabolisch charakterisieren zu können, wurde nach 16 h Kultivierung die Konzentration der Metabolite Glukose, Glutamin und Laktat im Kulturüberstand bestimmt. Die Zellen wurden für diesen Versuch mindestens eine Woche in dem jeweils für den Versuch genutzten Medium vorkultiviert. Für den Ansatz wurden die Zellen einmal bei 300 g 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 1 ml des jeweiligen Mediums resuspendiert. Nach dem Zählen wurden die Zellen in einer 48-Well-Flachbodenplatte in 500 µl Kulturen im jeweiligen Medium in den Zelldichten von 6×10^4 /ml und 2×10^5 /ml ausgesäht.

Nach 16 h wurden die Zellen gezählt und die Zellsuspension bei 300 g für 7 min zentrifugiert, um die Zellen vollständig zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Metabolitenbestimmung bzw. bis zur LC-MS/MS eingefroren.

Es wurden nur Veränderungen der Konzentrationen im Medium gemessen. Durch die Vorkultivierung konnten die Zellen in ihrem Stoffwechsel einen steady-state etablieren. Dieser konnte durch die kurzfristige Umsetzung in frisches Medium über die Aufnahme und Abgabe bestimmter Metaboliten erfasst werden.

6.2.1.5 Titration von Tyrosinkinaseinhibitoren

Die Sensitivität der BaF3-Zellen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren ist in Abhängigkeit vom vorhandenen Nährstoffangebot bestimmt worden. Dazu wurden Imatinib und Nilotinib im Standardmedium und dem Minimalmedium titriert. Nach mindestens einwöchiger Vorkultivierung in diesen Medien wurden die Zellen in 96-Well-Platten im jeweiligen Medium à 100 µl mit 6×10^4 /ml ausgesäht, die Tyrosinkinaseinhibitoren wurden hinzugefügt und nach 24 h sowie 48 h wurden die Zellen gezählt.

Die Konzentrationen für die Titrationsen wurden bewusst so gewählt, dass die Konzentrationen der Medikamente im Blutplasma unter Therapie eingeschlossen sind.

6.2.2 Biochemische Methoden

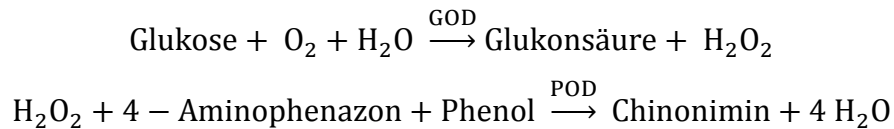
6.2.2.1 Bestimmung der Osmolarität

Um die Zellen unter optimalen Bedingungen kultivieren zu können, sollte auch die Osmolarität angepasst werden. Diese variiert mit der Gesamtkonzentration gelöster Teilchen. Für die Zellkultur ist es wichtig, dass die Osmolarität im Inneren der Zellen und in ihrer Umgebung annähernd gleich ist, um osmotischen Stress für die Zellen zu vermeiden. Für die Einstellung der Osmolarität wurde ein Gefrierpunktsmomometer verwendet. Dieses misst die durch gelöste Teilchen entstehende Gefrierpunktserniedrigung und rechnet mithilfe einer Kalibrierung (Standard mit 0,300 mosmol/kg) und eines Nullwertes (destilliertes Wasser) die Osmolarität der jeweiligen Lösung aus.

Für die Kultivierung der Zellen wurde durch die Zugabe von destilliertem Wasser oder NaCl-Lösung eine Osmolarität von $0,320 \pm 0,003$ mosmol/kg eingestellt.

6.2.2.2 Bestimmung der Glukosekonzentration

Die Glukosekonzentration wurde mit dem Glucose liquicolor Kit der Firma Human bestimmt. Der Nachweis beruht auf folgender enzymatischer Reaktion:

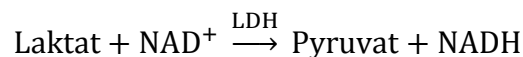


Die Glukosekonzentration ist hierbei direkt proportional der Chinoniminänderung, welche photometrisch bei 500 nm gemessen werden kann. Der Glukosewert kann dann mit Hilfe des Extinktionswertes einer Standardlösung mit der Konzentration von 5,5 mM wie folgt berechnet werden:

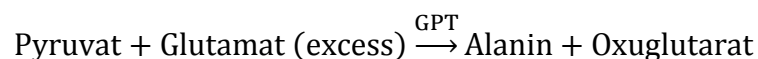
$$\text{Glukosekonzentration mM} = 5,5 \times \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}}$$

6.2.2.3 Bestimmung der Laktatkonzentration

Das Laktat wurde enzymatisch nach einer Methode von Dringen⁶³, modifiziert für niedrigere Probenvolumina von Xianojing Chen, bestimmt. Dabei wird der zum Laktat proportionale Anstieg der NADH Konzentration in folgender Reaktion gemessen.



Da es sich hierbei um eine reversible Reaktion handelt, wird Pyruvat über die Glutamat-Pyruvat-Transaminase bei einem vorhandenen Glutamatüberschuss aus dem Gleichgewicht entfernt.



Die NADH-Konzentration wird in einem Photometer bei 340 nm gemessen. Die Extinktionswerte wurden wiederum mittels einer Standardkurve aus einer Laktatverdünnungsreihe zwischen 0 mM und 5 mM in tatsächliche Laktatkonzentrationen umgerechnet.

$$\text{Laktatkonzentration} = \text{Anstieg der Standardkurve} \times \text{Extinktion der Probe}$$

6.2.2.4 LC-MS/MS

Die massenspektrometrische Untersuchung der Proben wurde im Zentrallabor des Instituts für Laboratoriumsmedizin in Zusammenarbeit mit PD Dr. rer.nat. Uta Ceglarek und Herr Lars Schinkel durchgeführt. Es wurde eine LC-MS/MS Analyse zur Detektierung von Aminosäuren und Acylcarnitinen durchgeführt⁶⁴.

Die MS ist eine Methode zur Messung von Atomen und Molekülen. Der zu messende Stoff wird in die Gasphase überführt und ionisiert. Durch ein elektrisches Feld werden die Ionen beschleunigt und dem Analysator zugeführt. Darin werden die Teilchen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis sortiert. Der nachgeschaltete Detektor registriert die zuvor sortierten Teilchen. Hierbei ist anzumerken, dass das Gerät lediglich Stoffe nach ihrer Masse und ihren Ladungen auftrennt. Die so erhaltenen Daten werden per Computersoftware ausgewertet und mittels vorher gemessenen bekannten Standards bestimmten Metaboliten zugeordnet. Obwohl die Methode in den letzten Jahren immer weiter verbessert wurde, kann es hierbei zu Überlagerungen und Analysefehlern durch andere Stoffe kommen. LC steht für liquid chromatographie. Die Flüssigchromatographie ist eine Methode zur Auftrennung von Stoffgemischen. Durch die Vorschaltung dieser Methode können die zu analysierenden Metabolite schon vorselektiert und die Genauigkeit der MS erhöht werden.

Der API 2000 ist ein Triple Quadrupol LC/MS/MS System. Hierbei werden nach der Flüssigchromatographie 3 Quadrupole als Analysatoren hintereinander geschaltet. Eine Quadrupol-Kammer besteht aus 4 Stabmagneten, die durch unterschiedlich angelegte Spannungen die Moleküle unterschiedlicher Massen beschleunigen und so herausfiltern. Dabei wird nur in der ersten und der letzten Kammer detektiert. Die mittlere Kammer, auch Stoßkammer genannt, dient der Fragmentierung der in der ersten Kammer detektierten Substanzen. In der letzten Kammer können dann spezifisch die noch einmal zerkleinerten Ionen gemessen werden. Somit wird eine schnelle und genaue Analytik bestimmter, vorher definierter Substanzen ermöglicht. Die Ionisation erfolgt hier mittels Elektrospray-Ionisierung, die Detektion durch pulse counting Channel elektron multipliziert.

6.2.3 Auswertung der Daten

Die Messdaten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Es wurden hauptsächlich deskriptive Statistiken verwendet. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. In den Diagrammen

der Zeitreihenversuche wurden jeweils die Mediane der Expansion dargestellt sowie durch die Fehlerbalken der Maximal- und der Minimalwert.

Für die Analyse der Unterschiede des langfristigen Wachstums zwischen den einzelnen Zelllinien in beiden Medien wurde das Wachstum der einzelnen Linien zu 11 Analysezeitpunkten miteinander verglichen. Es wurde zuerst eine Varianzanalyse für alle 3 Linien und danach ein Student's T-Test für unabhängige Stichproben zur Unterscheidung von je 2 Linien mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha=0,05$ durchgeführt.

Bei den Analysen der Metabolite wurden jeweils die Mittelwerte dargestellt und wiederum Maximal- und Minimalwert durch Fehlerbalken.

Obwohl bei einer Stichprobenzahl von drei nur die Auswertung mittels deskriptiver Statistik sinnvoll ist, sind in den Diagrammen klare und aufgrund der Deutlichkeit ernst zunehmende Tendenzen sichtbar. Ziel der Arbeit war es, Unterschiede im Stoffwechsel zwischen *BCR/ABL* exprimierenden Zellen und Zellen ohne Fusionsgen zu finden. Diese Unterschiede konnten in der Arbeit deutlich nachgewiesen werden.

7 Ergebnisse

7.1 Definition des Minimalmedium

7.1.1 FCS-Titrations

Zuerst wurden BaF3 + IL-3, BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 und BaF3-BCR/ABL + IL-3 in FCS-Konzentrationen zwischen 0 % und 20 % kultiviert. Die Titration des FCS wurde zu Beginn durchgeführt, da im FCS 6,2 mM Glukose vorhanden sind und somit die minimale FCS-Konzentration gleichzeitig die minimale, erreichbare Glukosemenge bestimmt.

In den Abbildung 4, 5 und 6 sind die Proliferation der Zelllinien unter den verschiedenen FCS-Konzentrationen dargestellt. Dabei ist auf der Ordinate der Median der Expansion der jeweiligen Zellkultur zu sehen, während auf der Abszisse die Versuchstage aufgetragen sind. Die Fehlerbalken geben absolut die maximalen und minimalen Werte an. Bei allen Zelllinien und Bedingungen sind die Zellen bei 0 % FCS sofort vollständig abgestorben, sodass am Tag 2 keine lebenden Zellen mehr gezählt werden konnten. In den Diagrammen wurden deswegen erst FCS-Konzentrationen ab 0,5 % dargestellt

Das maximale Wachstum ist bei allen Linien gleich. Es ist zu erkennen, dass BaF3 + IL-3 und BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 das annähernd maximale Wachstum bei 2 % FCS erreichen. Dagegen benötigt BaF3-BCR/ABL + IL-3 mehr FCS als die beiden anderen Linien und wächst erst ab 5 % FCS maximal. Für die weiteren Versuche wurde eine FCS-Konzentration von 2 % ausgewählt.

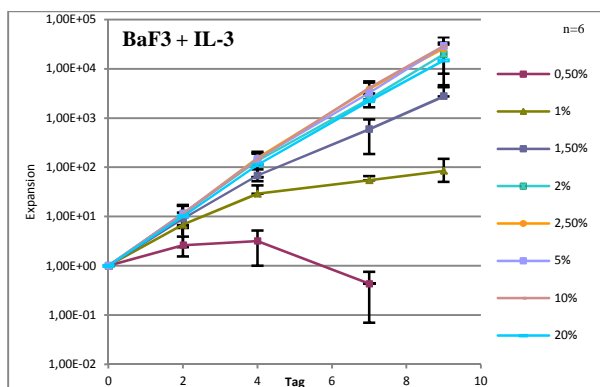


Abbildung 4 Wachstum von BaF3 + IL-3 bei verschiedenen FCS-Konzentrationen

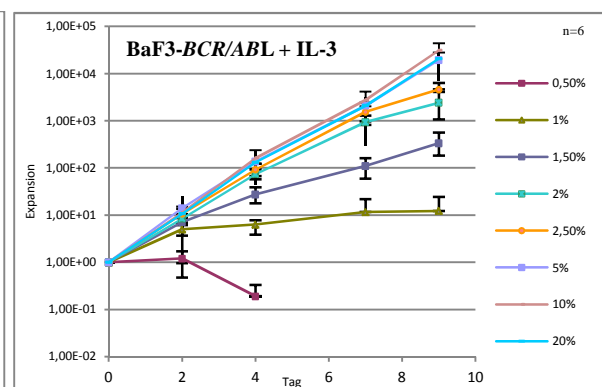


Abbildung 5 Wachstum von BaF3-BCR/ABL + IL-3 bei verschiedene FCS-Konzentrationen

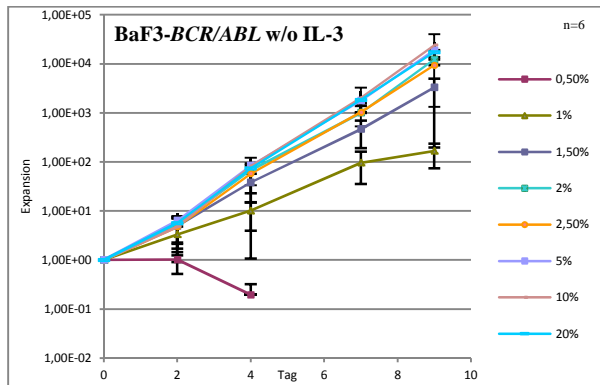


Abbildung 6 Wachstum von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei verschiedenen FCS-Konzentration

7.1.2 Glukosetitration

Anschließend wurde Glukose bei 2 % FCS titriert. Die im FCS enthaltene Glukose wurde bei der Zugabe berücksichtigt.

Die Abbildungen 7,8 und 9 zeigen die Proliferation der Zellen zwischen 0,5 mM und 11 mM Glukose (Glukosegehalt des RPMI Biochrome Mediums). Alle Zellen zeigen schon bei der geringsten Konzentration von 0,5 mM Glukose leichtes Wachstum. Bei niedrigeren Konzentrationen wächst BaF3-BCR/ABL+IL-3 schlechter als BaF3 + IL-3 und BaF3-BCR/ABL w/o IL-3. Hingegen ist bei hohen Glukosekonzentrationen bei allen Linien ein gleich starkes Wachstum zu sehen. Insgesamt steigt die Wachstumsgeschwindigkeit mit der Höhe der Glukosekonzentration bis 5 mM stetig an. Bei 5 mM ist das Wachstum maximal und kann durch weitere Glukosezugabe nicht weiter gesteigert werden. BCR/ABL und IL-3 erhöhen beide den Glukoseverbrauch. Sind beide Faktoren gleichzeitig vorhanden, führt das eventuell zu einem Aufbrauchen der vorhandenen Glukose und somit zu einem schlechteren Wachstum bei niedrigen Konzentrationen. Für die weiteren Versuche wurde eine Glukosekonzentration von 1,5 mM gewählt, weil sich bei dieser Konzentration das Wachstum von BaF3-BCR/ABL + IL-3 stark dem Wachstum der beiden anderen Linien annähert.

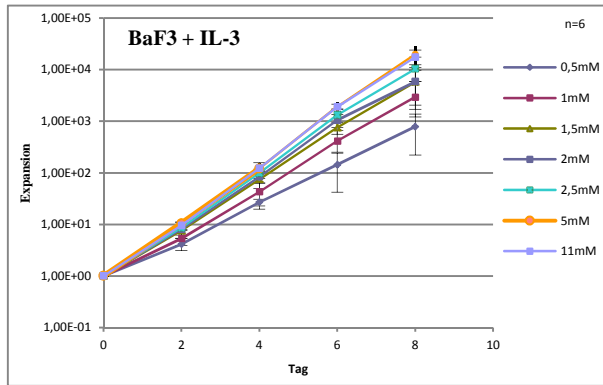


Abbildung 7 Wachstum von BaF3 + IL-3 bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

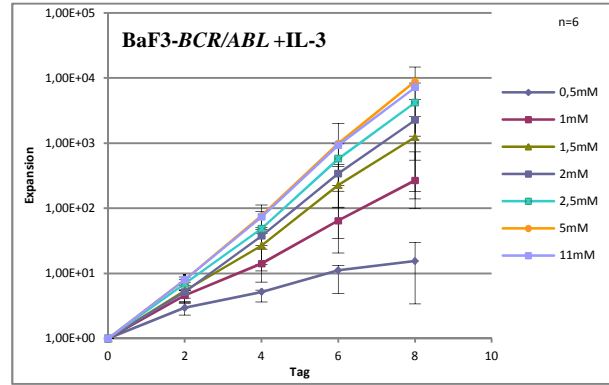


Abbildung 8 Wachstum von BaF3-BCR/ABL + IL-3 bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

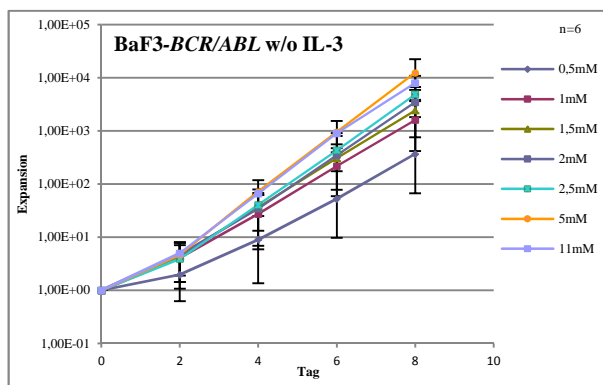


Abbildung 9 Wachstum von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

7.1.3 Glutamintitration über 0,5 mM

Glutamin wurde bei 2 % FCS und 1,5 mM Glukose im Bereich zwischen 0,5 mM und 10 mM titriert. Das maximale Wachstum von BaF3-BCR/ABL + IL-3 ist etwas geringer als das der anderen zwei Linien. Der Wachstumszuwachs bei höheren Glutaminkonzentrationen ist gering ausgeprägt (Abbildungen 10, 11 und 12). Für das Wachstum der Zellen scheinen die Glukose und FCS-Restriktion so limitierend zu sein, dass Glutaminkonzentrationen ab 0,5 mM ausreichend sind.

Für das Minimalmedium wurde eine Glutaminkonzentration von 1 mM festgelegt. Zusätzlich wurde eine Titration mit niedrigeren Glutaminkonzentrationen geplant.

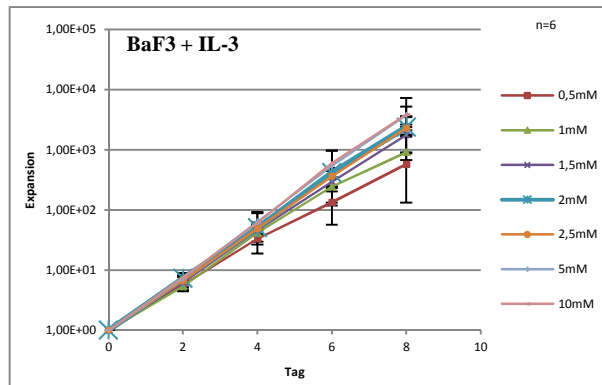


Abbildung 10 Wachstum von BaF3 + IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen

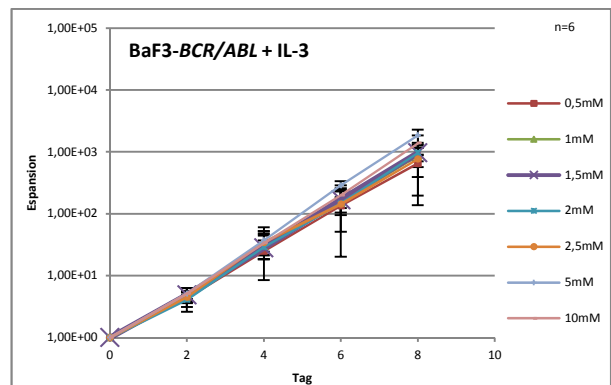


Abbildung 11 Wachstum von BaF3-BCR/ABL + IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen

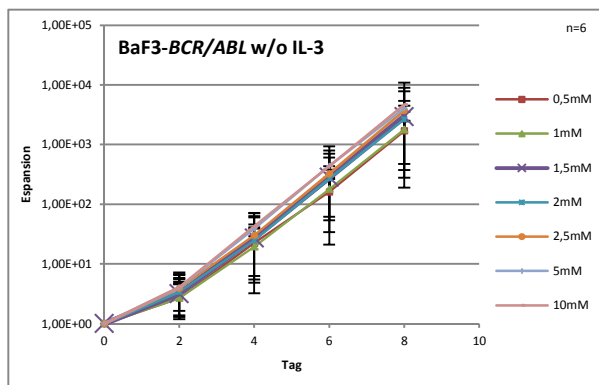


Abbildung 12 Wachstum von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen

7.1.4 IL-3 Titration

Um BaF3-Zellen an ihrer unteren Wachstumsgrenze kultivieren zu können, muss auch der benötigte Wachstumsfaktor IL-3 auf das Minimum reduziert werden. Dafür wurde IL-3 im RPMI-SM bei 2 % FCS, 1 mM Glukose und 1,5 mM Glutamin titriert.

BaF3 sterben sofort ab, wenn kein IL-3 vorhanden ist. Es reichen bereits 2 U/ml für ein maximales Wachstum aus. Bei höheren IL-3 Konzentrationen ist ein leicht schlechteres Wachstum zu beobachten. Das könnte an der Titration im Minimalmedium liegen. IL-3 regt die Aufnahme der schon limitierten Nährstoffe an und kann somit zu einer früheren Depletion derer führen. Die Expansion der Zellen bei den verschiedenen IL-3 Konzentrationen ist in dargestellt.

BaF3-*BCR/ABL*, dargestellt in Abbildung 14 wachsen ohne IL-3 am schnellsten. Auch hier verschlechtert sich das Wachstum leicht, je mehr IL-3 im Medium vorhanden ist. Für das Minimalmedium ist somit eine IL-3 Zugabe von 2 U/ml ausreichend.

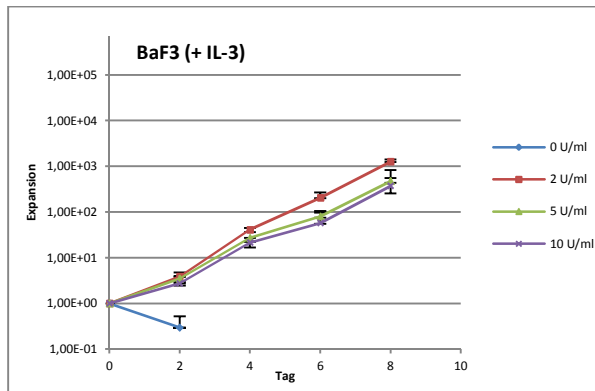


Abbildung 13 Wachstum von BaF3 ohne Fusionsgen bei der Titration von IL-3

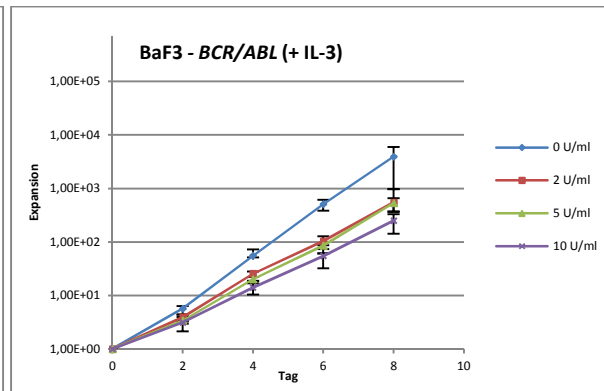


Abbildung 14 Wachstum von BaF3-*BCR/ABL* bei der Titration von IL-3

7.1.5 Glutamintitration unter 0,5 mM

Da bei der Glutamintitration mit Konzentrationen über 0,5 mM keine starke Abhängigkeit von Glutamin gezeigt werden konnte, wurde sie bei 2 % FCS, 1,5 mM Glukose und 2 U/ml r-IL-3 mit Glutaminkonzentrationen zwischen 0mM und 0,5 mM fortgesetzt (siehe Abbildungen 15, 16 und 17). BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 wachsen unter diesen Bedingungen etwas schneller als die zwei anderen Linien. Bei 0 mM Glutamin überleben BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 mit annähernd konstanter Zellzahl, während BaF3 + IL-3 und BaF3-*BCR/ABL* +IL-3 vollständig absterben. Insgesamt benötigen BaF3-Zellen deutlich weniger Glutamin, als üblicherweise im Standardmedium (2 mM) angeboten wird.

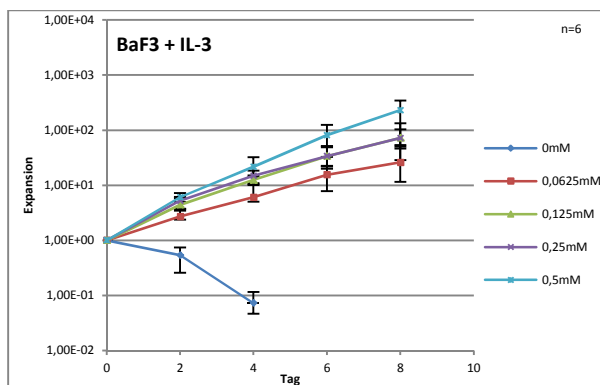


Abbildung 15 Wachstum von BaF3 + IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen unter 0,5 mM

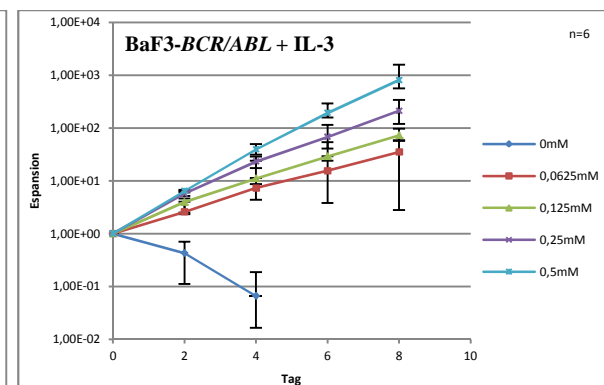


Abbildung 16 Wachstum von BaF3-*BCR/ABL* + IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen unter 0,5 mM

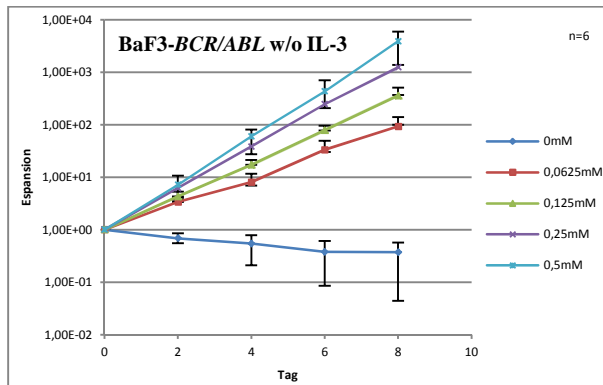


Abbildung 17 Wachstum von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei verschiedenen Glutaminkonzentrationen unter 0,5 mM

7.1.6 Zusammensetzung des Minimalmediums

Nach umfangreicher Titration der einzelnen Metabolite wurde das Minimalmedium wie folgt definiert:

- RPMI-SM
- 2 % FCS
- 1,5 mM Glukose
- 1 mM Glutamin
- je nach Bedingung 2 U/ml r-IL-3

Langfristig wachsen alle Zelllinien im Minimalmedium langsamer als im Standardmedium. Während in letzterem die Zellen unter allen Bedingungen gleichschnell wachsen (ANOVA: $p=0,78$), ist im Minimalmedium ein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den drei Bedingungen zu ermitteln (ANOVA: $p=0,002$). Während sich BaF3 + IL-3 und BaF3-BCR/ABL + IL-3 nicht signifikant voneinander unterscheiden (T-Test: $p=0,2$), zeigt der T-Test zwischen BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 und BaF3 + IL-3 ($p=0,002$) und BaF3-BCR/ABL + IL-3 ($p=0,001$) einen signifikanten Unterschied. Die Daten wurden über einen Zeitraum von 22 Tagen erfasst und anhand der 11 Analysezeitpunkte, an denen die Zellen gesplittet wurden, miteinander verglichen. Die Expansion der Zellen in den beiden Medien zeigen Abbildung 18 und Abbildung 19, das Wachstum an den einzelnen Tagen ist im Anhang abgebildet.

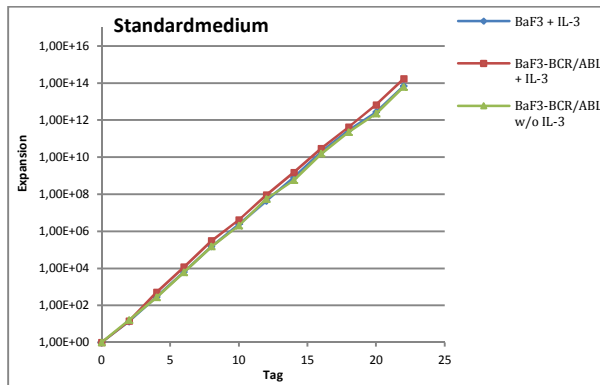


Abbildung 18 Expansion der Zelllinien im Standardmedium über 22 Tage

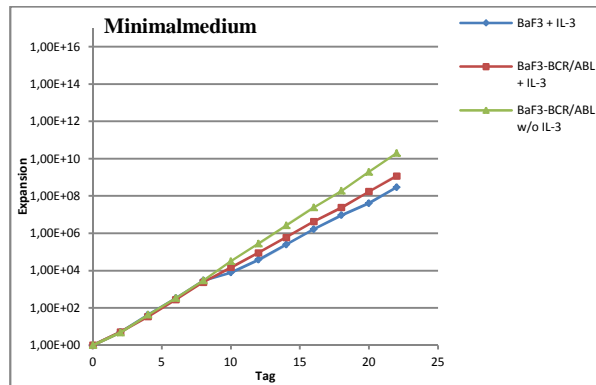


Abbildung 19 Expansion der Zelllinien im Minimalmedium über 22 Tage

7.2 Metabolitenbestimmung

7.2.1 Definition der Einsäzellzahl

Um Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien zu sehen, wurden der Verbrauch von Glukose und Glutamin sowie die Produktion von Laktat nach 16 h vergleichend zwischen Minimalmedium und Standardmedium gemessen. Um die Unterschiede möglichst deutlich hervorheben zu können, wurden die Experimente nicht nur in der üblichen Einsäzelldichte von 6×10^4 Zellen/ml durchgeführt, sondern auch mit der höheren Dichte von 2×10^5 Zellen/ml. Nach Auswertung der ersten Ergebnisse wurde jedoch ersichtlich, dass eine höhere Einsäzelldichte und die daraus resultierende höhere Zellzahl nach 16h nicht nur den Umsatz der Metabolite steigert, sondern zusätzlich zu einer Verschiebung des Verbrauchs bzw. der Produktionen führt. Beispielhaft ist das für die Laktatproduktion (Abbildung 20) und den Glukoseverbrauch (Abbildung 21) im Minimalmedium dargestellt. Auf der Ordinate ist jeweils der Verbrauch bzw. die Produktion des Metaboliten (Differenz zwischen gemessener Konzentration im Medium und gemessener Konzentration der Probe) in $\mu\text{mol}/10^4$ Zellen abgebildet, bezogen auf die nach 16 h gezählte Zellzahl. Die Experimente wurden mit 3 Wells je Bedingung durchgeführt. Der Median wird in der Abbildung durch den Balken dargestellt, die Fehlerbalken zeigen die Messwerte der beiden übrigen Wells an.

Während BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei der kleineren Einsäzellzahl noch am meisten Laktat produziert, zeigt diese Linie bei einer höheren Zelldichte die geringste Laktatproduktion je 10^4 Zellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es parakrine Effekte gibt, durch die sich die Zellen bei einer höheren Zelldichte gegenseitig beeinflussen. Zudem können indirekte Effekte der höheren Zelldichte hinzukommen, da beispielsweise zuvor produzierte Metabolite

wie Laktat bei einer höheren Zellzahl wieder schneller in die Zellen aufgenommen werden können.

Um diese Effekte zu umgehen, wurden folgend nur die Proben mit einer Einsäzellichte von 6×10^4 Zellen/ml ausgewertet.

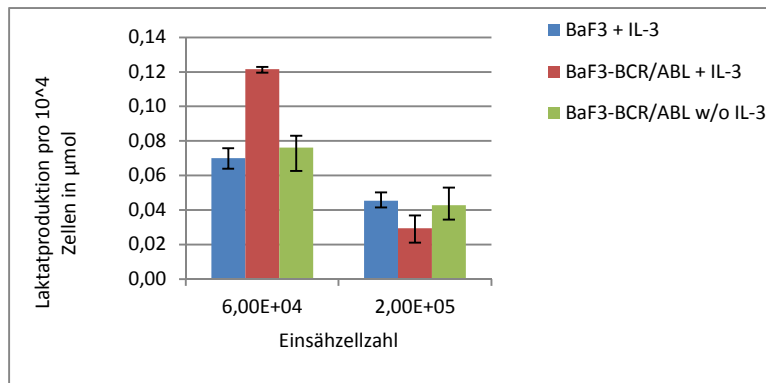


Abbildung 20 Laktatproduktion im Minimalmedium pro 10000 Zellen/ml

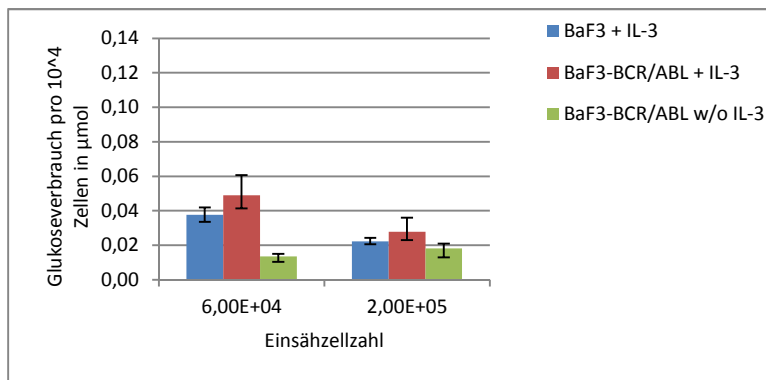


Abbildung 21 Glukoseverbrauch pro 10000 Zellen/ml

7.2.2 Bestimmung des Glukoseverbrauchs

Bei der Messung des Glukoseverbrauches, dargestellt in Abbildung 22, fielen deutliche Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen Medien, als auch zwischen den Zelllinien auf.

BaF3-BCR/ABL + IL-3 verbrauchen in beiden Medien am meisten Glukose. Die beiden Linien mit dem BCR/ABL-Fusionsgen verbrauchen bei Überangebot von Nährstoffen mehr Glukose, als im Minimalmedium vorhanden ist. Hingegen zeigen BaF3 + IL-3 im Standardmedium trotz Überangebot keine Erhöhung des Verbrauchs von Glukose.

Die Ergebnisse im Standardmedium sprechen dafür, dass *BCR/ABL* den Energieumsatz in den Zellen steigert. Da die Zellen jedoch nicht stärker wachsen als BaF3 + IL-3, entspricht diese Steigerung eher einer Verminderung der Effektivität der Energieverwertung.

Dieser Effekt durch *BCR/ABL* ist jedoch nicht zu beobachten, wenn die Nährstoffe in geringer Konzentration vorhanden sind. Hier zeigt BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 sogar den geringsten Verbrauch. IL-3 steigert im Minimalmedium deutlich den Glukoseverbrauch der Zellen mit *BCR/ABL*-Fusionsgenen.

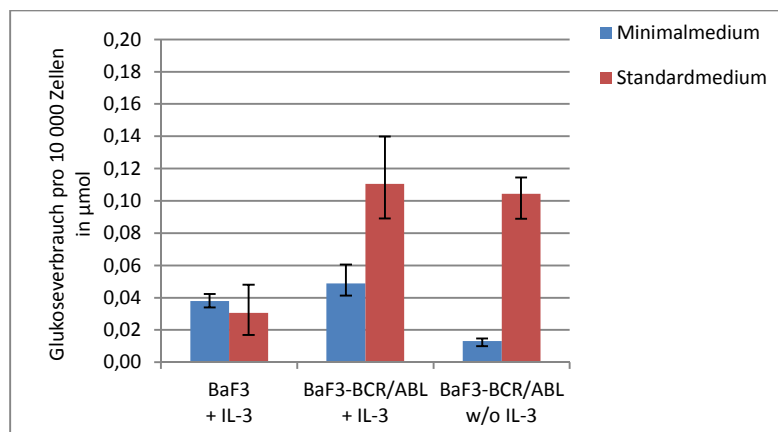


Abbildung 22 Glukoseverbrauch pro 10^4 Zellen

7.2.3 Bestimmung der Laktatproduktion

Da die Laktatproduktion (dargestellt in Abbildung 23) eng mit dem Glukoseverbrauch zusammen hängt, wurde diese darauf folgend gemessen. Laktat entsteht durch die Laktatdehydrogenase aus Pyruvat, welches das Endprodukt der Glykolyse ist und auch in den Zitronensäurezyklus eingespeist werden kann. Aus einem Mol Glukose (C6-Körper) können bei anaerober Glykolyse 2 Mol Laktat (C3-Körper) entstehen. Bei allen drei Linien steigt die Laktatproduktion bei Überangebot von Nährstoffen, die Zellen produzieren trotz des Vorhandenseins von Sauerstoff wahrscheinlich über anaerobe Glykolyse Laktat. Bemerkenswert ist diese Entwicklung vor allem bei BaF3 + IL-3, da sich der Glukoseverbrauch bei Überangebot nicht erhöht.

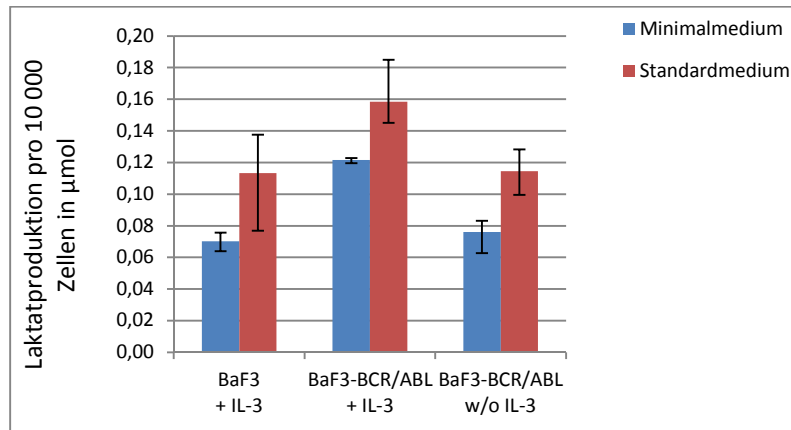


Abbildung 23 Laktatproduktion pro 10^4 Zellen

7.2.4 LC-MS/MS

In der Massenspektrometrie wurden semiquantitativ die Aminosäuren analysiert. Im Folgenden sind die Werte der Messdaten auf der Ordinate aufgetragen, auf der Abszisse sind die beiden Medien unterschieden. Da es sich um eine semiquantitative Messung handelt, sind die Messdaten ohne Einheit dargestellt. Nicht die absoluten Zahlen sind für die Aussage entscheidend, sondern die Verhältnisse der Werte der verschiedenen Zelllinien zueinander und zum Medium. Dargestellt sind die Zelllinien BaF3 + IL-3 und BaF3-BCR/ABL + IL-3 und jeweils die nativen Medien. Es wird hier eine Auswahl der Aminosäuren gezeigt, bei denen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Linien zu sehen waren. Die Daten weiterer Aminosäuren sind im Anhang dargestellt. Die Werte von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 ergaben aufgrund von zu starker Streuung keine verwertbaren Unterschiede.

Am Beispiel von Alanin wird deutlich, dass die gemessenen Verhältnisse der Aminosäuren die Tendenzen in den Medien richtig widerspiegeln. Im auf RPMI von Biochrome basierenden Standardmedium wurden geringe Konzentrationen Alanin gemessen, da im RPMI Biochrome kein Alanin vorhanden ist und somit natives Standardmedium nur Alanin aus zugegebenem FCS und IL-3 konditioniertem Medium enthält. Im nativen Minimalmedium, welches auf RPMI-SM basiert, ist hingegen durch Zugabe von 300 mg/l viel Alanin enthalten (siehe Tabelle 1 und Abbildung 24 A).

Im Standardmedium ist zu sehen, dass die meisten Aminosäuren bei beiden Zelllinien nach 16 h Kultivierung in etwas geringerer oder gleicher Konzentration vorliegen, als im nativen Medium. Folglich verbrauchen sowohl BaF3 + IL-3 als auch BaF3-BCR/ABL + IL-3 Aminosäuren.

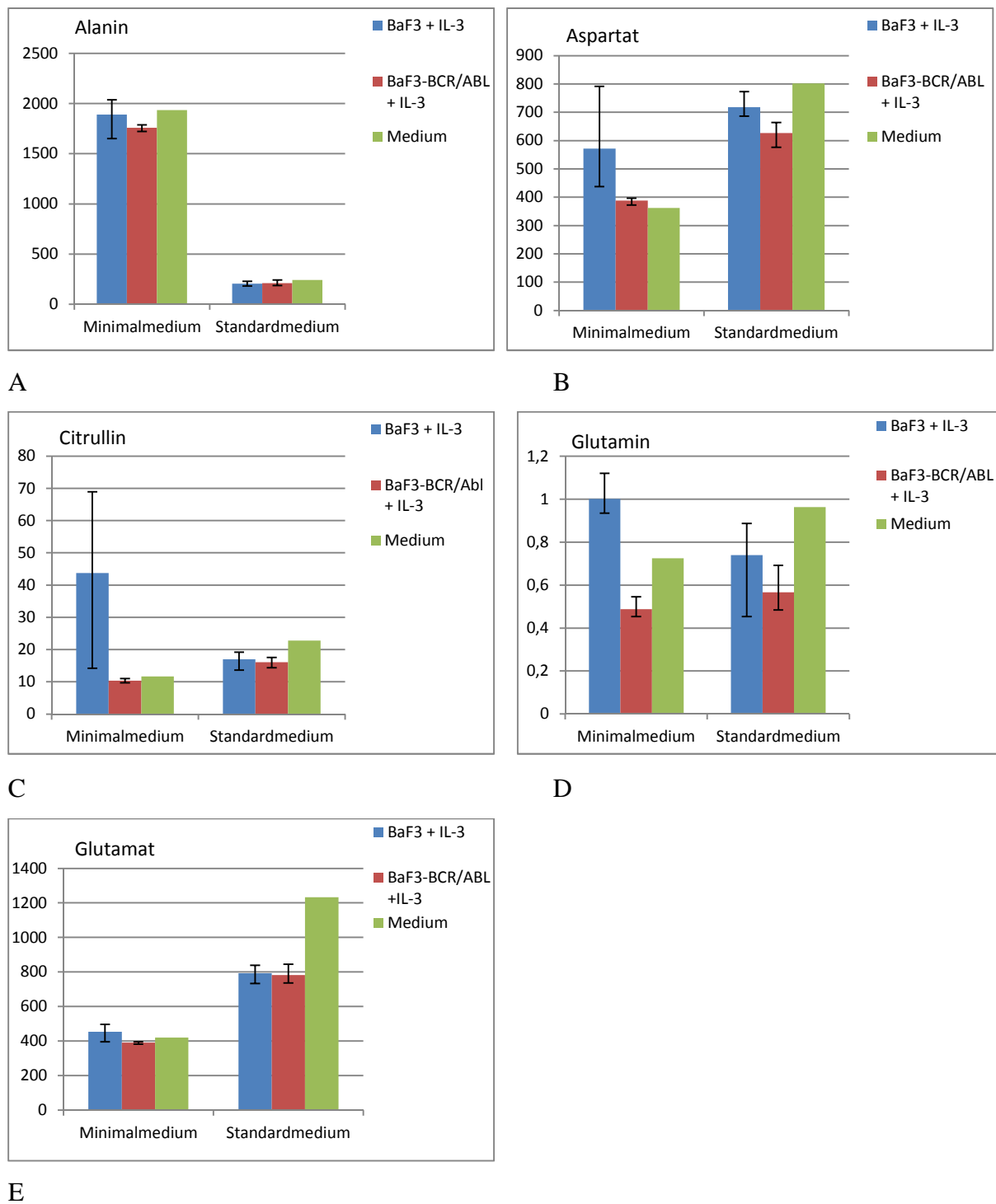


Abbildung 24 Darstellung der Messwerte der LC-MS/MS von A: Alanin; B: Aspartat; C: Citrullin; D: Glutamin; E: Glutamat der LC-MS/MS

Betrachtet man nun das Minimalmedium so wird ersichtlich, dass es hier größere Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien gibt.

Während sich bei BaF3-*BCR/ABL* + IL-3 auch im Minimalmedium die Konzentration der Aminosäuren im Vergleich zum nativen Medium verringert oder nicht wesentlich ändert, werden von BaF3 + IL-3 die Aminosäuren Glutamin, Glycin, Aspartat, Histidin und Citrullin (siehe Abbildung 24 und Anhang) ins Medium abgegeben. Die weiteren Aminosäuren liegen in ähnlichen Mengen wie im nativen Medium vor.

Die Abgabe von Aminosäuren könnte auf eine verstärkte Proteinolyse und den Abbau von Aminosäuren hinweisen, da auch die Metabolite des Harnstoffzyklus wie Citrullin und Aspartat vermehrt auftreten.

7.2.5 Übersicht über Metabolitenveränderungen

Tabelle 4 Übersicht über Verbrauch/Produktion von Metaboliten

	BaF3 + IL-3		BaF3- <i>BCR/ABL</i> + IL-3		BaF3- <i>BCR/ABL</i> w/o IL-3	
	Minimal medium	Standard medium	Minimal medium	Standard medium	Minimal medium	Standard medium
Glukose	--	--	--	---	-	---
Laktat	++	+++	+++	+++	++	+++
Glutamin	+	--	--	--		
Aspartat	++	+/-	+/-	-		
Citrullin	+++	+/-	+/-	+/-		
Histidin	++	-	+/-	-		
Glycin	++	-	+/-	-		

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenfassung der Metabolitenmessung in den Überständen. Dabei stehen rot-markierte Zellen und „---“, für starken Verbrauch eines Metaboliten, grüner Hintergrund und „+++“ für starke Bildung und folglich gelb und „+/-“, für keine bzw. geringe Veränderungen. In der Tabelle wird noch einmal deutlich, dass große Konsequenzen der *BCR/ABL* Expression im Glukosestoffwechsel im Standardmedium liegen, welche sich im Minimalmedium jedoch nicht mehr so stark zeigen. Bei der Messung der Aminosäuren ist hingegen Gegensätzliches aufgefallen. Während sich die Zellreihen im Standardmedium sehr ähnlich sind, unterscheiden sie sich im Minimalmedium deutlich.

7.3 Titration der Tyrosinkinaseinhibitoren

7.3.1 Imatinib

In den bisherigen Versuchen konnte ein deutlicher Einfluss von *BCR/ABL* auf den Stoffwechsel gezeigt werden. Dieser veränderte Stoffwechsel könnte *BCR/ABL*-positive Tumorzellen in den schlecht mit Nährstoffen versorgten Teilen des Knochenmarks betreffen. Da die Wirksamkeit der Medikamente gerade im Bereich der Tumorzellen im Knochenmark von großer Bedeutung ist, wurde folgend der Einfluss der verschiedenen Medien auf die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren untersucht.

Dazu wurde bei BaF3-*BCR/ABL* sowohl im Minimal-als auch im Standardmedium Imatinib in Konzentrationen zwischen 0 μ M und 5 μ M titriert. Auch hier wurde der zusätzliche Einfluss von IL-3 auf die Proliferation unter dem Medikament untersucht. Die Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen das Wachstum der Zellen nach 48 h Kultivierungszeit unter verschiedenen Konzentrationen Imatinib im Vergleich zu einer Kontrolle (0 mM Imatinib, 100 % Wachstum), die im gleichen Zeitraum ohne Imatinib kultiviert wurde. Dargestellt sind der Median sowie durch die Fehlerbalken die Minimal-und Maximalwerte.

Bei BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 zeigt Imatinib im Minimalmedium eine geringere Wirkung als im Standardmedium. Während die Zellen im Minimalmedium bei einer Konzentration von 2,5 μ M Imatinib im Median noch auf über 50 % der Kontrolle gewachsen sind, erreichen die Zellen im Standardmedium nur weniger als 20 % des Kontrollwachstums. Bei der Konzentration von 5 μ M kommt es im Standardmedium zum nahezu vollständigen Absterben der Zellen, während die Zellen im Minimalmedium immer noch ein Wachstum von ca. 20 % der Kontrolle zeigen. Diese Beobachtung ist eine mögliche Erklärung, warum es mit Imatinib nicht gelingt, alle Tumorstammzellen im Knochenmark zu eliminieren.

Die Zelllinie BaF3-*BCR/ABL* + IL-3 zeigt ein anderes Verhalten. Zusätzliches IL-3 schwächt die Wirkung von Imatinib erheblich ab, da die Zellen neben den Signalen durch *BCR/ABL* auch andere proliferationsfördernde Signale erhalten. Bei 5 μ M Imatinibzugabe wird in beiden Medien immer noch ein Wachstum von mindestens 50 % der Kontrolle erreicht.

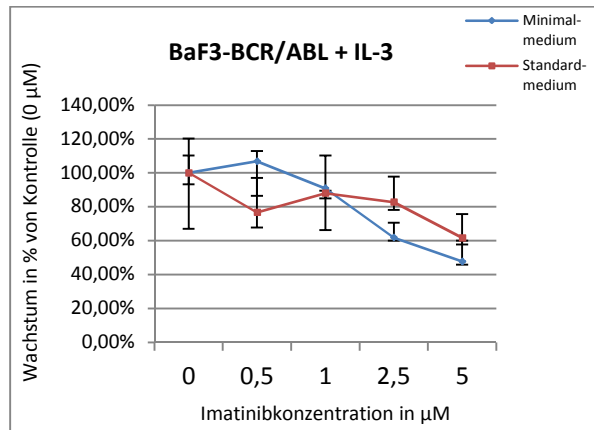


Abbildung 25 Prozentuales Wachstum nach Imatinibzugabe gemessen am Kontrollwachstum ohne Imatinib nach 48 h BaF3-BCR/ABL + IL-3

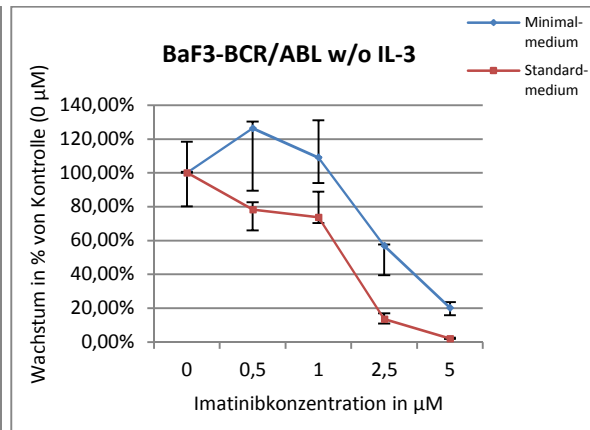


Abbildung 26 Prozentuales Wachstum nach Imatinibzugabe gemessen am Kontrollwachstum ohne Imatinib nach 48 h BaF3-BCR/ABL w/o IL-3

7.3.2 Nilotinib

Nilotinib als Tyrosinkinaseinhibitor der zweiten Generation zeigt eine stärkere Affinität zu *BCR/ABL* und somit schon bei geringeren Mediumkonzentrationen als Imatinib eine Wirkung auf die Zellen. Die Proliferation unter dem Einfluss von Nilotinib ist in Abbildung 27 und Abbildung 28 dargestellt.

BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 zeigt bei beiden Medien einen ähnlichen Wachstumsabfall bei steigender Nilotinibkonzentration. Auffällig ist das bessere Wachstum bei 1 µM Nilotinib als bei 0,5 µM im Minimalmedium. Bei der Höchstkonzentration von 5 µM Nilotinib sind die Zellen in beiden Medien nahezu vollständig abgestorben. Die Ergebnisse könnten die bessere Wirksamkeit von Nilotinib erklären, da es auch unter nährstoffarmen Bedingungen, wie in der Stammzellnische, eine gute Wirksamkeit gegen *BCR/ABL* zeigt.

Beim zusätzlichen Vorhandensein von IL-3 zeigen BaF3-BCR/ABL in beiden Medien bei der maximalen Nilotinibkonzentration noch Wachstum. Hier unterscheidet sich das Wachstum jedoch stark zwischen den beiden Medien. Die Zellen bleiben im Minimalmedium wesentlich stärker sensibel auf Nilotinib. Es kommt zwar nicht zum vollständigen Absterben, wie bei der Kultivierung ohne IL-3, aber zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums auf unter 20 % bei 5 µM Nilotinib. Im Standardmedium wachsen die Zellen trotz gleicher Medikamentenkonzentration noch auf 60 % der Kontrolle. Insgesamt scheinen die Zellen die proliferationsfördernde Wirkung von IL-3 bei Nilotinibtherapie nur unter nährstoffreichen Bedingungen nutzen zu können.

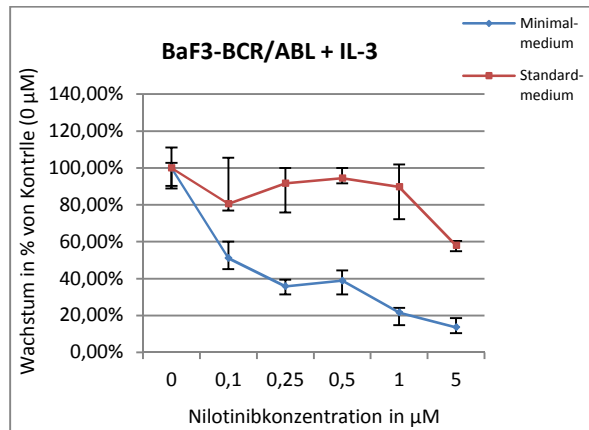


Abbildung 27 Prozentuales Wachstum bei Nilotinibzugabe gemessen am Kontrollwachstum ohne Nilotinib nach 48h BaF3-BCR/ABL + IL-3

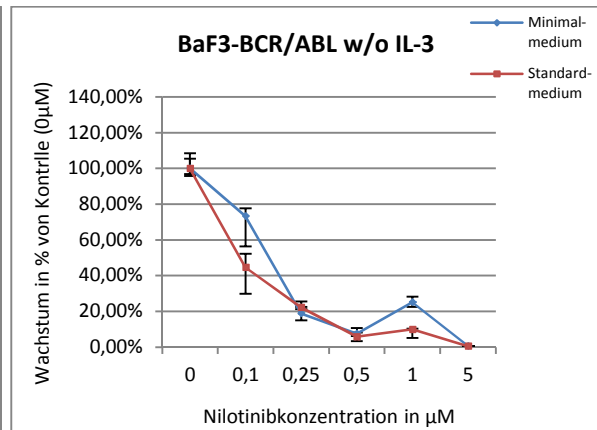


Abbildung 28 Prozentuales Wachstum bei Nilotinibzugabe gemessen am Kontrollwachstum ohne Nilotinib nach 48h BaF3-BCR/ABL w/o IL-3

8 Diskussion

Nachdem der Metabolismus von Krebszellen durch die Entdeckung von genetischen Veränderungen wie Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in den Hintergrund geraten war, rückt er nun wieder in den Fokus der Forschung. Denn auch in der metabolischen Umprogrammierung können Erkenntnisse zur Tumorentstehung, zum Fortschreiten der Erkrankung und zur Therapie gewonnen werden⁶⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* metabolische Unterschiede zwischen BaF3-Zellen mit und ohne *BCR/ABL*-Mutation untersucht. Es wurde ersichtlich, dass die Expression von *BCR/ABL* sowohl unter Standardkulturbedingungen als auch unter Nährstoffrestriktion den Stoffwechsel der Zellen entscheidend beeinflusst.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die metabolische Umgebung den Stoffwechsel der Zellen verändert und, dass diese Veränderung des Nährstoffangebots durch Einflüsse auf die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren therapeutische Relevanz hat.

8.1 Proliferation im Minimal- und im Standardmedium

Eine Zielstellung der Arbeit war es zu überprüfen, wie *BCR/ABL* den Zellen zu einem Wachstumsvorteil verhilft. Während im Standardmedium beide Zelllinien unter allen Bedingungen gleich starkes Wachstum zeigten, proliferierten BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 im Minimalmedium stärker. Das könnte ein Hinweis auf das bessere Überleben in der Knochenmarksnische sein, da dort in den arterienfernen Arealen von nährstoffarmen Bedingungen auszugehen ist¹¹. *BCR/ABL* führt bei den Zellen unter diesen Bedingungen zu stärkerer Proliferation, als bei Zellen ohne das Fusionsgen. Während der chronischen Phase gelingt es so den *BCR/ABL*-positiven Stammzellen auch in nährstoffknappen Arealen des Knochenmarks zu expandieren. Somit könnte das einen Mechanismus darstellen, durch den *BCR/ABL*-positive Tumorzellen ein Übergewicht im Knochenmark gewinnen.

8.2 Veränderungen der Glukoseaufnahme

BaF3-*BCR/ABL* nehmen im Standardmedium verstärkt Glukose auf

Die Messung der Glukose im Überstand brachte das Ergebnis, dass die *BCR/ABL* exprimierenden Zellen im Standardmedium mehr Glukose verbrauchen als BaF3-Zellen ohne das Fusionsgen. Diese Beobachtung war zu erwarten, da *BCR/ABL* durch verstärkte Expression des GLUT-1 Transporters die Glukoseaufnahme in die Zelle steigert⁵⁷.

Obwohl die Zellen mit *BCR/ABL*-Fusionsgen wesentlich mehr Glukose aufnehmen, ist kein stärkeres Wachstum zu beobachten als bei den BaF3-Zellen. Auch die Laktatproduktion ist im Verhältnis nicht so viel höher, wie die Glukoseaufnahme. Durch *BCR/ABL* verbrauchen die Zellen offensichtlich viel Glukose, ohne sie in Laktat umzuwandeln. Da auch keine verstärkte Bildung von Aminosäuren zu beobachten war, könnten die Zellen die Glukose für aerobe Glykolyse und die de novo Synthese von Fettsäuren benutzen. An OCI-AML3-Zellen als Modell für leukämische Zellen wurde bereits beobachtet, dass diese Zellen das Kohlenstoffgerüst der Glukose für die Neusynthese von Fettsäuren nutzen⁶⁶.

Obwohl BaF3 ohne das Fusionsgen eine geringere Glukoseaufnahme zeigten, produzierten diese Zellen verhältnismäßig viel Laktat. Dieses Laktat muss aus einer anderen Quelle als Glukose stammen, da mehr als doppelt so viel Laktat produziert wurde, als Glukose verbraucht wurde. Bei der anaeroben Glykolyse können aus einem Mol Glukose jedoch maximal 2 Mol Laktat entstehen. Das zusätzliche Laktat kann beispielsweise auch über den Abbau von Aminosäuren produziert werden.

Geringere Glukoseaufnahme im Minimalmedium von BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3

Im Minimalmedium konnte die verstärkte Glukoseaufnahme durch *BCR/ABL* nicht beobachtet werden. Da die vorhandene Glukosemenge im Minimalmedium geringer war, als die Glukosemenge, die die Zellen mit *BCR/ABL* im Standardmedium aufgenommen haben, musste sich bezüglich der Glukoseaufnahme im Minimalmedium das Verhalten ändern. Überraschend war hier, dass BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 weniger Glukose aufnahm, als BaF3 + IL-3.

BCR/ABL aktiviert die Glykolyse über die Proteinkinase S6K1. Wird diese Kinase gehemmt, kommt es zu einer verminderten glykolytischen Aktivität in Zellen mit *BCR/ABL*-Fusionsgen. Dennoch kommt es nicht wie erwartet zum vermehrten Zelltod, sondern zu einer kompensatorischen Aktivierung der Fettsäureoxidation. Die Inaktivierung der S6K1 führt so zu einem besseren Überleben der verschiedenen Zelllinien mit *BCR/ABL*-Fusionsgen in einem glukose-reduzierten Medium. Erst die gleichzeitige Hemmung der Fettsäureoxidation führt zu einem

verstärkten Zelltod⁶⁷. Eventuell wird im Minimalmedium über das dauerhaft verminderte Glukoseangebot ebenfalls die Glykolyse bzw. S6K1 supprimiert und somit die Fettsäureoxidation verstärkt. Samudio konnte zeigen, dass die β -Oxidation in leukämischen Zellen eine wichtige Rolle spielt und, dass in deren Hemmung ein neuer Therapieansatz liegen könnte⁶⁶. Durch die Vorkultivierung hatten die Zellen Zeit, sich an das nährstoffarme Medium zu gewöhnen und ihren Stoffwechsel so umzustellen, dass weiterhin eine proliferative Aktivität zu beobachten war. Das Wachstum von BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 trotz vermindertem Glukoseangebot und vermindertem Glukoseverbrauch zeigt in jedem Fall, dass die Zellen neben Glukose einen anderen Metaboliten zur Energiegewinnung heranziehen können. Ob es sich hierbei wie vermutet um Fettsäuren handelt, könnte in einer mitochondrialen Proteomanalyse überprüft werden.

BaF3-*BCR/ABL* + IL-3 nehmen im Minimalmedium eine ähnliche Menge Glukose auf wie BaF3 + IL-3. An dieser Stelle könnte die Stimulation der Glukoseaufnahme durch IL-3 den Unterschied begründen. Während die Glukoseaufnahme durch die Expression von *BCR/ABL* nicht weiter gefördert wird, steigert der Wachstumsfaktor die Aufnahme weiterhin.

8.3 Veränderung des Aminosäuremetabolismus

Aminosäurefreisetzung durch BaF3 + IL-3 im Minimalmedium

BaF3 + IL-3 verbrauchen im Standardmedium und im Minimalmedium ungefähr gleich viel Glukose. Dennoch ist ihr Wachstum im Minimalmedium deutlich langsamer als im Standardmedium, was darauf hinweist, dass für diese Zellen nicht Glukose, sondern andere Metabolite limitierend sind.

Auffällig ist, dass bei BaF3 + IL-3 nach Kultivierung im Minimalmedium mehr freie Aminosäuren (Glutamin, Glycin, Aspartat, Histidin, Citrullin) nachzuweisen sind, als im nativen Medium. Folglich müssen von den Zellen Aminosäuren freigesetzt werden. Dafür könnten BaF3 + IL-3 Proteine aus dem FCS-Serum nutzen, die abgebaut werden, um Aminosäuren zu erhalten und diese sowohl zum Struktur- als auch für den Energiestoffwechsel zu verwenden. Auch die stark erhöhte Konzentration von Citrullin und Aspartat als Metabolite des Harnstoffzyklus im Überstand der BaF3 + IL-3 weist auf eine Proteinolyse hin. Der Harnstoffzyklus ist für die Zellen ein Weg überflüssigen Stickstoff abzugeben. Werden Aminosäuren für die Energiegewinnung abgebaut, wird nur das Kohlenstoffgerüst in den Citrat Zyklus eingespeist. Die Aminogruppe muss dann als Harnstoff ausgeschieden werden. Zudem sind

Metabolite des Harnstoffzyklus, wie Carbamoylphosphat und Aspartat auch gleichzeitig wichtige Bausteine der Pyrimidinbiosynthese und somit Voraussetzung für die Zellteilung⁴. Um zu überprüfen, ob der Harnstoffzyklus in den Zellen verstärkt genutzt wird, ist ebenfalls eine mitochondriale Proteomanalyse zu empfehlen.

Da alle Aminosäuren ausgenommen Glutamin sowohl im Standard als auch im Minimalmedium in ähnlichen Konzentrationen vorliegen, können die Aminosäuren in der vorliegenden Menge nicht wachstumslimitierend sein. Auch die Glukoseaufnahme ist in beiden Medien annähernd gleich, somit scheint Glukose ebenfalls nicht wachstumslimitierend zu wirken. Folglich scheinen andere Einflüsse, wie beispielsweise die Limitierung des Wachstumsfaktors IL-3 oder des FCS, zu der Präferenz zu führen, Proteine abzubauen.

Aminosäureverbrauch im Minimalmedium von BaF3-BCR/ABL + IL-3

BaF3-BCR/ABL + IL-3 zeigen im Minimalmedium hingegen keine erhöhten Aminosäurekonzentrationen in den Überständen. Sie könnten ihren Energiebedarf über die β -Oxidation decken, wie es bereits bei anderen leukämischen Zellen beschrieben wurde⁶⁶. Dem entsprechend könnten sie, obwohl sie im Minimalmedium weniger Glukose aufnehmen als im Standardmedium, die Aminosäuren ausschließlich zum Strukturstoffwechsel und nicht als Energiequelle nutzen. Der Aminosäureverbrauch der meisten Aminosäuren ist im Minimalmedium geringer als im Standardmedium. Das könnte jedoch auch durch die langsamere Wachstumsgeschwindigkeit begründet werden.

Überleben von BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 ohne Glutamin

Auffällig ist weiterhin, dass BaF3-BCR/ABL w/o IL-3 bei der Titration von Glutamin als einzige Zellen auch ohne Glutamin überlebt (siehe Abbildung 17). Diese Beobachtung stützt weiterhin die These, dass BCR/ABL im Minimalmedium zu einem verstärkten Fettsäuremetabolismus zur Energiebereitstellung in den Zellen führt. Somit könnten die Zellen die vorhandene Glukose zur Produktion der zum Überleben der Zelle benötigten Menge Glutamin genutzt haben.

Es wird außerdem ersichtlich, dass BaF3-BCR/ABL + IL-3 ohne Glutamin nicht überleben können. Der zusätzliche Wachstumsfaktor scheint nicht nur die Glukoseaufnahme zu verstärken, sondern die Zellen auch abhängiger von Glutamin zu machen. In diesem Fall wirkt sich IL-3 durch die Aktivierung der Zellen negativ auf das Überleben aus.

8.4 Tyrosinkinaseinhibitortitrationen

Am Ende der Arbeit wurde betrachtet, ob eine veränderte metabolische Umgebung das Ansprechen auf die Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren verändern kann.

Geringeres Ansprechen auf Imatinib im Minimalmedium verglichen zum Standardmedium

Zuerst wird das Verhalten der Zellen bei Imatinibzugabe besprochen. Bei der Imatinibtitration von BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 überleben die Zellen im Minimalmedium höhere Imatinibkonzentrationen als im Standardmedium. Die Beobachtung wurde auch bei Konzentrationen von 2,5 μ M und 5 μ M Imatinib gemacht, welche den therapeutischen Bereich des Medikaments widerspiegeln. Sie passt außerdem zum Überleben der Zellen in der nährstoffärmeren Knochenmarksnische und könnte eine Erklärung für das Überleben von *BCR/ABL*-positiven Tumorstammzellen unter Therapie sein.

Außerdem wurde die zusätzliche Wirkung von IL-3 untersucht. Im Standardmedium führt zusätzliches IL-3 zum einem schlechteren Ansprechen auf Imatinib.

Im Minimalmedium könnte zusätzliches IL-3 nun zwei Konsequenzen haben. Zum einen könnte es die langsamer proliferierenden Zellen zusätzlich aktivieren und somit empfindlicher für die Behandlung mit TKIs machen. Da bei IL-3 Zugabe im Minimalmedium kein verstärktes Wachstum zu sehen ist, ist das hier unwahrscheinlich.

Zum anderen könnte zusätzliches IL-3, wie im Standardmedium, die von *BCR/ABL* unabhängige Proliferation fördern und die Zellen so weniger imatinibsensitiv machen. Betrachtet man die Proliferation bei zusätzlich vorhandenem Wachstumsfaktor, so zeigt sich, dass zusätzliches IL-3 unabhängig vom Medium zu einer geringeren Imatinibsensitivität führt. Das Knochenmark ist reich an Wachstumsfaktoren und Zytokinen, da diese bei der physiologischen Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen eine wichtige Rolle spielen. Folglich könnte auch hier eine Begründung dafür liegen, dass die Zellen mit *BCR/ABL*-Fusionsgen im Knochenmark eine Imatinibtherapie überleben. Das könnte ein weiterer Grund für das Verbleiben von *BCR/ABL* positiven Tumorstammzellen trotz Imatinibtherapie sein.

Höhere Sensibilität auf Nilotinib in beiden Medien

Bei der Nilotinibtitration fällt auf, dass es bei BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 keine Wachstumsunterschiede zwischen den Medien gibt. Nilotinib wirkt wahrscheinlich durch seine stärkere Affinität zu *BCR/ABL* auch unter nährstoffarmen Bedingungen bei langsamerer Proliferation effektiver als Imatinib. Wie auch schon von Weisberg gezeigt werden konnte, verhilft im

Standardmedium zusätzliches IL-3 zu einer geringeren Nilotinibsensitivität und somit zu einem besseren Überleben von BaF3-Zellen³⁹. Im Gegensatz dazu bringt zusätzliches IL-3 im Minimalmedium nur einen geringeren Überlebensvorteil bei Nilotinibbehandlung. Obwohl zusätzliches IL-3 die Zellen metabolisch verändert, scheint es sie im Minimalmedium nicht vollständig unabhängig von *BCR/ABL* zu machen. Eventuell ist eine Restaktivität von *BCR/ABL* für das Überleben der Zellen nötig. Diese Restaktivität kann vom wesentlich affineren Wirkstoff Nilotinib besser gehemmt werden als von Imatinib. Das könnte ein Hinweis auf das bessere Wirken von Nilotinib auf imatinibresistente Zellen im Knochenmark erklären. Während Imatinib in der nährstoffarmen, aber wachstumsfaktorreichen Umgebung eine verringerte Wirkung auf Zellen mit *BCR/ABL*-Expression zeigt, wird mit Nilotinib unter gleichen Bedingungen eine potentere Wirkung erzielt.

Glukosestoffwechsel als Ansatzpunkt von Imatinib ist im Minimalmedium bereits verändert

Die Kontrolle des Glukosestoffwechsels bzw. der Glukoseaufnahme ist ein wichtiger Teil des Wirkungsmechanismus von Imatinib. Boren konnten zeigen, dass durch Imatinib weniger Glukose in die Zellen aufgenommen und weniger Glukose für die Neusynthese von Nukleotiden und Fettsäuren verwendet wird. Außerdem wird die Nutzung von Glukose im Pentocephosphatweg verändert⁶⁸. Zudem wurde beschrieben, dass eine Imatinibbehandlung die glykolytische Aktivität von Zellen hemmt und die Konzentration von Phosphokreatin in den Zellen als Vertreter des Energiespiegels senkt⁵⁸.

Betrachtet man nun BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 im Minimalmedium, verglichen zum Standardmedium, so ist die Glukoseaufnahme bereits erniedrigt. Die Zellen haben sich einer veränderten metabolischen Umgebung bereits angepasst und müssen ihre Energie und Metabolite bereits aus anderen Quellen beziehen. Wird nun mit Imatinib behandelt, so kann die Wirkung auf die Glukoseaufnahme nur eingeschränkt erfolgen, da sich der Metabolismus in den Zellen bereits an eine niedrige Glukoseaufnahme angepasst hat. Der Wegfall dieses Teils des Wirkmechanismus von Imatinib im Minimalmedium könnte die geringere Sensitivität der BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 auf die Imatinibbehandlung erklären.

Einfluss von Imatinib auf den Stoffwechsel

In der Zusammenschau der Ergebnisse fällt auf, dass nährstoffarme Bedingungen einen Vorteil für Zellen mit *BCR/ABL* darstellen. Im Minimalmedium haben BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 einen Wachstumsvorteil und die Wirkung von Imatinib ist abgeschwächt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Imatinibtherapie auch Einfluss auf den Stoffwechsel der Patienten hat. Bei der Behandlung von Patienten, die zusätzlich zur CML einen Typ 2 Diabetes hatten, fiel auf, dass unter der Imatinibtherapie die Nüchternblutglukosewerte niedriger wurden⁶⁹, sodass sogar die antidiabetische Therapie reduziert werden konnte. Diese Verbesserung der Blutglukosespiegel könnte auf erhöhte Adiponektinspiegel unter der Imatinibtherapie zurückgeführt werden⁷⁰. Dieser für den Patienten als positiv gesehene Aspekt der Verbesserung des Diabetes mellitus könnte jedoch auch zu einer stärkeren Imatinibresistenz führen.

Insgesamt ist es für die Zukunft wichtig, dass die Wechselwirkungen von Tyrosinkinaseinhibitoren und metabolischer Umgebung in beide Richtungen genauer untersucht werden.

8.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *BCR/ABL* den Stoffwechsel von Zellen entscheidend beeinflusst und zu einem Wachstumsvorteil im nährstoffarmen Medium führt.

Abhängig von der metabolischen Umgebung kann die Translokation zu unterschiedlichen Stoffwechselaktivitäten in den Zellen führen. Obwohl der Gebrauch von Zelllinien ein etablierter Bestandteil der Forschung ist, handelt es sich dabei nur um Modellsysteme. Der nächste Schritt wäre, die Ergebnisse an Primärzellen aus dem Knochenmark von erkrankten Patienten zu überprüfen.

Außerdem können *in vitro* Experimente die Bedingungen *in vivo* nur nachstellen. Der Einfluss der metabolischen Umgebung auf das Überleben der Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Es ist wichtig, dass die Experimente *in vitro* die Bedingungen *in vivo* so gut wie möglich abbilden. Dafür wäre eine genauere Erforschung der Stammzellnische von entscheidender Bedeutung.

Der Effekt der metabolischen Umgebung auf die Wirkung der Tyrosinkinaseinhibitoren wurde bisher unterschätzt. Der in der Arbeit gezeigte Einfluss des Nährstoffangebots auf die Wirksamkeit der Tyrosinkinaseinhibitoren könnte an Patienten mit Diabetes mellitus überprüft werden, indem der Einfluss der Blutzuckerwerte und Therapieerfolge korreliert werden.

9 Zusammenfassung

Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist eine myeloproliferative Krankheit. Sie ist durch das Vorliegen des Philadelphia Chromosoms charakterisiert, einer reziproken Translokation von Chromosom 9 und 22. Daraus resultiert das Fusionsgen *BCR/ABL*, welches zu der dauerhaften Aktivierung der Tyrosinkinase c-Abl führt. Die einzige heilende Therapie der CML ist die Stammzelltransplantation, die Krankheit kann jedoch seit der Entdeckung von Tyrosinkinaseinhibitoren wie Imatinib und Nilotinib, welche an der ATP-binding-site von *BCR/ABL* binden und somit die Phosphorylierung und damit Aktivierung von nachgeschalteten Signalproteinen verhindern, gut eingedämmt werden. Trotz der Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren gelingt es *BCR/ABL*-positiven Tumorstammzellen im Knochenmark zu überleben.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass *BCR/AB* zu einem erhöhten Glukosestoffwechsel führt und ein Wirkmechanismus von Imatinib die Hemmung der Glukoseaufnahme und der Glykolyse ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung des Stoffwechsels von BaF3-Zellen in Abhängigkeit von der Expression von *BCR/ABL* und in Abhängigkeit von der metabolischen Umgebung untersucht. BaF3-Zellen sind vom Wachstumsfaktor IL-3 abhängig. Diese Abhängigkeit geht durch das Einbringen des *BCR/ABL*-Fusionsgens verloren. In den Experimenten wurden BaF3-Zellen ohne das Fusionsgen mit IL-3 (BaF3 + IL-3) und BaF3-Zellen mit dem Fusionsgen (BaF3-*BCR/ABL*) mit (+) und ohne (w/o) IL-3 kultiviert.

Es wurde in Zeitreihenversuchen ein nährstoffarmes Minimalmedium ermittelt, in dem die Metabolite Glutamin und Glukose sowie FCS auf die Konzentrationen reduziert wurden, bei der die Zellen gerade noch ein deutliches Wachstum zeigten. In diesem nährstoffarmen Medium proliferierten BaF3-*BCR/ABL* w/o IL-3 schneller als BaF3 + IL-3 und BaF3-*BCR/ABL* + IL-3. Das könnte ein Hinweis auf das bessere Überleben von Zellen mit der *BCR/ABL*-Mutation in arterienfernen, nährstoffarmen Arealen des Knochenmarks während der chronischen Phase der Erkrankung sein.

Um den Einfluss des Nährstoffgehalts der Umgebung auf den Metabolismus der Zellen zu zeigen, wurden die Zellen vergleichend im Minimalmedium und Standardmedium kultiviert und Glukose und Laktat enzymatisch in den Überständen analysiert, sowie die Aminosäurekonzentrationen mittels LC-MS/MS ermittelt. Bei den Analysen der Metabolite konnte bestätigt werden, dass *BCR/ABL* im Standardmedium die Glukoseaufnahme steigert. Im Minimalmedium ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Dort zeigen Zellen mit *BCR/ABL* ohne zusätz-

lichen Wachstumsfaktor sogar eine verminderte Glukoseaufnahme. Da die Zellen dennoch gute Proliferationsraten hatten, kann angenommen werden, dass sie im Minimalmedium ihren Stoffwechsel auf alternative Energiequellen, beispielsweise Fettsäuren, umstellen können.

BaF3 + IL-3 proliferieren im Minimalmedium weniger als im Standardmedium, verbrauchen aber genauso viel Glukose. Es müssen somit andere Stoffe auf das Zellwachstum limitierend wirken. Außerdem geben die Zellen ohne das Fusionsgen im Minimalmedium Aminosäuren an das Medium ab. Die gesteigerte Abgabe von Citrullin und Aspartat lässt auf einen verstärkten Harnstoffzyklus schließen, was auf einen erhöhten Protein- und Aminosäureabbau zur Energiegewinnung hinweist.

Zellen mit *BCR/ABL*-Mutation hingegen geben auch im Minimalmedium keine Aminosäuren an das Medium ab. Sie scheinen ohne den Abbau von Proteinen ihren Energie- und Strukturstoffwechsel bestreiten zu können.

Um den Einfluss der metabolischen Umgebung auf die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren zu ermitteln, wurden Imatinib und Nilotinib vergleichend in den beiden Medien titriert. Die antiproliferative Wirkung von Imatinib auf die Zellen ist im Minimalmedium abgeschwächt. Das könnte ein Grund für das Überleben von *BCR/ABL*-positiven Tumorstammzellen in nährstoffarmen Arealen des Knochenmarks während der chronischen Phase der Erkrankung und trotz Therapie mit Imatinib sein. Ein Erklärungsansatz für die geringere Imatinibsensitivität ist, dass die Zellen im Minimalmedium bereits eine verminderte glykolytische Aktivität haben, somit kann Imatinib auf diesem Weg nicht mehr wirken.

Die Wirkung des *BCR/ABL*-affineren Wirkstoffes Nilotinib wird durch Nährstoffrestriktion nicht eingeschränkt. Es wirkt im Standard- und im Minimalmedium annähernd gleich. Das kann ein Grund für die bessere Wirksamkeit von Nilotinib auf Zellen in der Knochenmarksnische sein. Der protektive Effekt von IL-3 auf das Überleben der Zellen im Minimalmedium ist unter Nilotinib schwächer ausgeprägt als im Standardmedium.

Die Ergebnisse zeigen, dass *BCR/ABL* den Stoffwechsel der Zellen entscheidend verändert und dadurch einen Wachstumsvorteil in der Stammzellnische bewirkt. Sie liefern einen Erklärungsansatz für das Überleben von *BCR/ABL*-positiven Tumorstammzellen und bieten neue Ansatzpunkte für die Therapie der CML.

10 Literaturverzeichnis

1. Aumüller G. *Anatomie: 208 Tabellen*. Stuttgart: Thieme; 2007. Duale Reihe.
2. Riede U. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5th ed. Stuttgart: G. Thieme; 2004. Thieme E-book library.
3. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C. *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-29036-2>.
4. Heinrich PC, Löffler G. *Biochemie und Pathobiochemie*. 9th ed. Heidelberg: Springer; 2010. Springer-Lehrbuch.
5. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
6. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):11-21.
7. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-846.
8. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-1121.
9. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-631.
10. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001;81(2):685-696.
11. Eliasson P, Jönsson J. The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. *J. Cell. Physiol*. 2010;222(1):17-22.
12. NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst*. 1960;25:85-109.
13. NOWELL PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut*. 1962;8:65-66.
14. Bartram CR, Klein A de, Hagemeijer A, et al. Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 1983;306(5940):277-280.

15. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, Klein A de, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. 1984;36(1):93-99.
16. ROWLEY JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-293.
17. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-350.
18. Hernandez SE, Krishnaswami M, Miller AL, Koleske AJ. How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol*. 2004;14(1):36-44.
19. Wang JY. Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*. 2000;19(49):5643-5650.
20. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88(7):2375-2384.
21. Ilaria RL, JR, van Etten RA. P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem*. 1996;271(49):31704-31710.
22. Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol*. 1991;11(2):1107-1113.
23. Sattler M, Salgia R, Okuda K, et al. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene*. 1996;12(4):839-846.
24. Puil L, Liu J, Gish G, et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J*. 1994;13(4):764-773.
25. Hazlehurst LA, Bewry NN, Nair RR, Pinilla-Ibarz J. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control*. 2009;16(2):100-107.
26. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med*. 2003;138(10):819-830.
27. Chronische Myeloische Leukämie (CML) — Onkopedia. <http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/cml>. Accessed April 18, 2013.

28. Baccarani M, Pileri S, Steegmann J, Muller M, Soverini S, Dreyling M. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii72-7.
29. Bruns I, Czibere A, Fischer JC, et al. The hematopoietic stem cell in chronic phase CML is characterized by a transcriptional profile resembling normal myeloid progenitor cells and reflecting loss of quiescence. *Leukemia.* 2009;23(5):892-899.
30. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood.* 2013;122(6):872-884.
31. Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* 2010;120(7):2254-2264.
32. *Harrison's principles of internal medicine.* 18th ed. New York, N.Y. [u.a.]: McGraw-Hill; 2012.
33. European Medicines Agency. <http://www.ema.europa.eu/ema/>. Accessed April 27, 2013.
34. Furet P, Caravatti G, Lydon N, et al. Modelling study of protein kinase inhibitors: binding mode of staurosporine and origin of the selectivity of CGP 52411. *J Comput Aided Mol Des.* 1995;9(6):465-472.
35. Zimmermann J, Buchdunger E, Mett H, Meyer T, Lydon NB. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 1997;7(2):187-192.
36. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2(5):561-566.
37. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia.* 2002;16(11):2190-2196.
38. Manley PW, Breitenstein W, Bruggen J, et al. Urea derivatives of STI571 as inhibitors of Bcr-Abl and PDGFR kinases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004;14(23):5793-5797.
39. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell.* 2005;7(2):129-141.
40. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006;354(24):2542-2551.
41. Guilhot F, Hughes TP, Cortes J, et al. Plasma exposure of imatinib and its correlation with clinical response in the Tyrosine Kinase Inhibitor Optimization and Selectivity Trial. *Haematologica.* 2012;97(5):731-738.

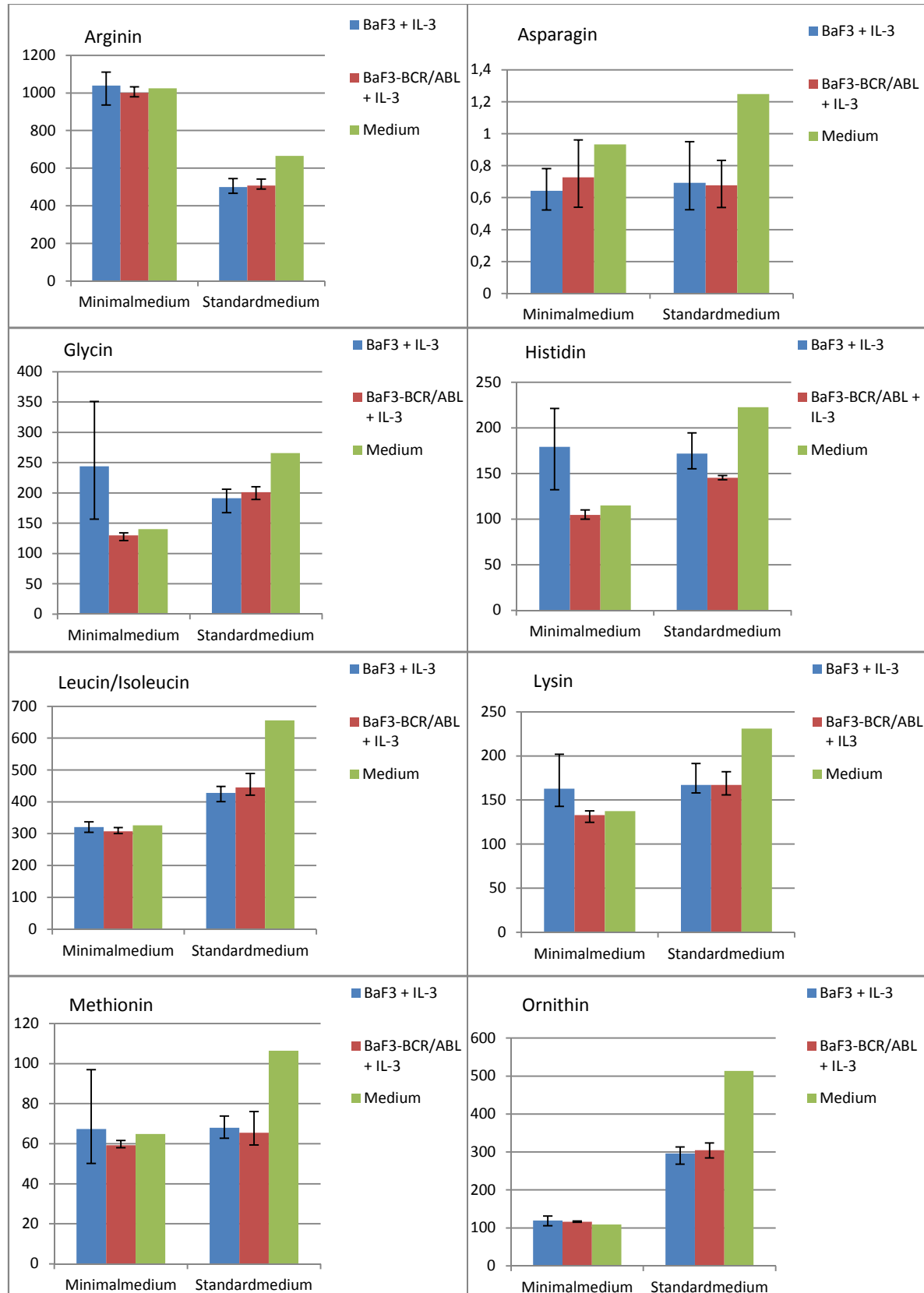
-
42. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-4028.
 43. Graham SM, Jorgensen HG, Allan E, et al. Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood*. 2002;99(1):319-325.
 44. Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevarn B, et al. Combination of pegylated IFN- 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(12):3228-3235.
 45. Palacios R, Steinmetz M. Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*. 1985;41(3):727-734.
 46. Daley GQ, Baltimore D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210BCR/ABL protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(23):9312-9316.
 47. Shimamura T, Ji H, Minami Y, et al. Non-small-cell lung cancer and Ba/F3 transformed cells harboring the ERBB2 G776insV_G/C mutation are sensitive to the dual-specific epidermal growth factor receptor and ERBB2 inhibitor HKI-272. *Cancer Res*. 2006;66(13):6487-6491.
 48. Stephens P, Edkins S, Davies H, et al. A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet*. 2005;37(6):590-592.
 49. Eder M, Geissler G, Ganser A. IL-3 in the clinic. *Stem Cells*. 1997;15(5):327-333.
 50. Parada Y, Banerji L, Glassford J, et al. BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *J Biol Chem*. 2001;276(26):23572-23580.
 51. Warmuth M, Kim S, Gu X, Xia G, Adrian F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol*. 2007;19(1):55-60.
 52. Bubnoff N von, Barwisch S, Speicher MR, Peschel C, Duyster J. A cell-based screening strategy that predicts mutations in oncogenic tyrosine kinases: implications for clinical resistance in targeted cancer treatment. *Cell Cycle*. 2005;4(3):400-406.
 53. Bradeen HA, Eide CA, O'Hare T, et al. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: high efficacy of drug combinations. *Blood*. 2006;108(7):2332-2338.

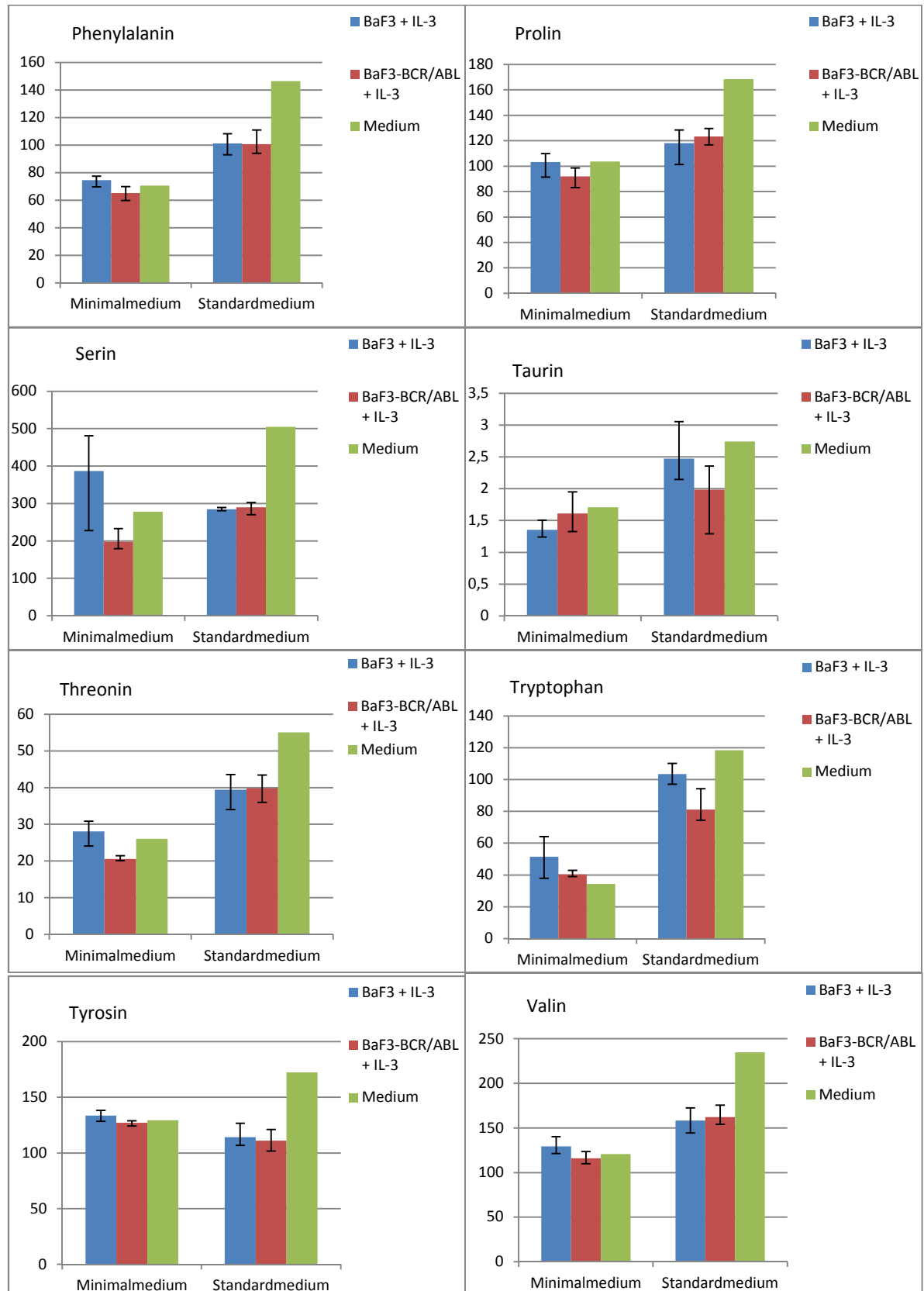
-
54. Kan O, Baldwin SA, Whetton AD. Apoptosis is regulated by the rate of glucose transport in an IL-3-dependent haemopoietic cell line. *Biochem Soc Trans.* 1994;22(3):275S.
 55. Bentley J, Itchayan D, Barnes K, et al. Interleukin-3-mediated cell survival signals include phosphatidylinositol 3-kinase-dependent translocation of the glucose transporter GLUT1 to the cell surface. *J Biol Chem.* 2003;278(41):39337-39348.
 56. Bentley J, Walker I, McIntosh E, Whetton AD, Owen-Lynch PJ, Baldwin SA. Glucose transport regulation by p210 Bcr-Abl in a chronic myeloid leukaemia model. *Br J Haematol.* 2001;112(1):212-215.
 57. Barnes K, McIntosh E, Whetton AD, Daley GQ, Bentley J, Baldwin SA. Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation. *Oncogene.* 2005;24(20):3257-3267.
 58. Klawitter J, Kominsky DJ, Brown JL, et al. Metabolic characteristics of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *British Journal of Pharmacology.* 2009;158(2):588-600.
 59. Mason EF, Zhao Y, Goraksha-Hicks P, et al. Aerobic Glycolysis Suppresses p53 Activity to Provide Selective Protection from Apoptosis upon Loss of Growth Signals or Inhibition of BCR-Abl. *Cancer Research.* 2010;70(20):8066-8076.
 60. Giuntoli S, Tanturli M, Di Gesualdo F, Barbetti V, Rovida E, Dello Sbarba P. Glucose availability in hypoxia regulates the selection of chronic myeloid leukemia progenitor subsets with different resistance to imatinib-mesylate. *Haematologica.* 2011;96(2):204-212.
 61. La Rosee P, Corbin AS, Stoffregen EP, Deininger MW, Druker BJ. Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res.* 2002;62(24):7149-7153.
 62. Karasuyama H, Melchers F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur. J. Immunol.* 1988;18(1):97-104.
 63. Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 1993;623(2):208-214.
 64. Brauer R, Leichtle AB, Fiedler GM, Thierry J, Ceglarek U. Preanalytical standardization of amino acid and acylcarnitine metabolite profiling in human blood using tandem mass spectrometry. *Metabolomics.* 2011;7(3):344-352.
 65. Semenza GL. A return to cancer metabolism. *J Mol Med.* 2011;89(3):203-204.

-
66. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J. Clin. Invest.* 2010;120(1):142-156.
 67. Barger JF, Gallo CA, Tandon P, et al. S6K1 determines the metabolic requirements for BCR-ABL survival. *Oncogene.* 2012;32(4):453-461.
 68. Boren J, Cascante M, Marin S, et al. Gleevec (STI571) influences metabolic enzyme activities and glucose carbon flow toward nucleic acid and fatty acid synthesis in myeloid tumor cells. *J Biol Chem.* 2001;276(41):37747-37753.
 69. Breccia M. Imatinib Mesylate May Improve Fasting Blood Glucose in Diabetic Ph+ Chronic Myelogenous Leukemia Patients Responsive to Treatment. *Journal of Clinical Oncology.* 2004;22(22):4653-4655.
 70. Fitter S, Vandyke K, Schultz CG, White D, Hughes TP, Zannettino ACW. Plasma Adiponectin Levels Are Markedly Elevated in Imatinib-Treated Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients: A Mechanism for Improved Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic CML Patients? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2010;95(8):3763-3767.

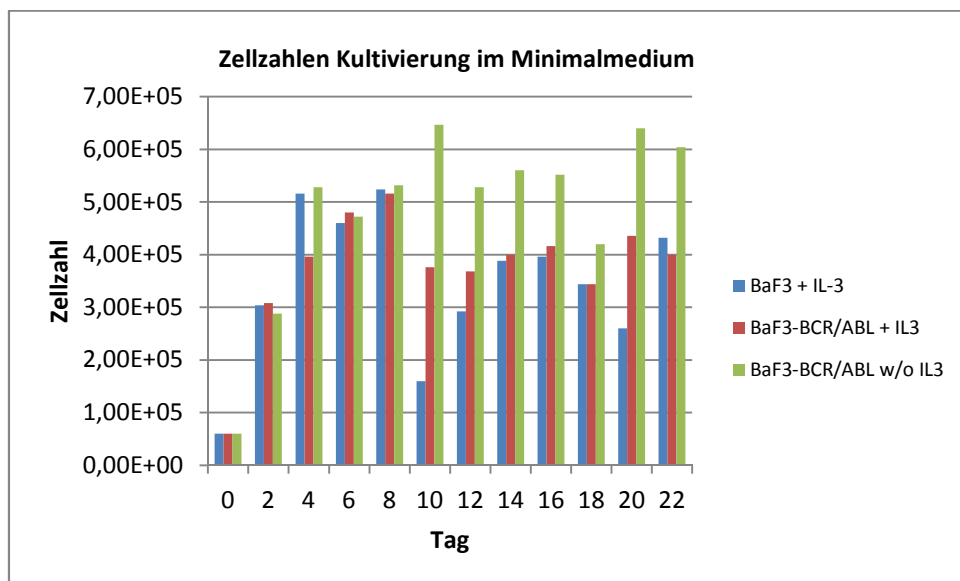
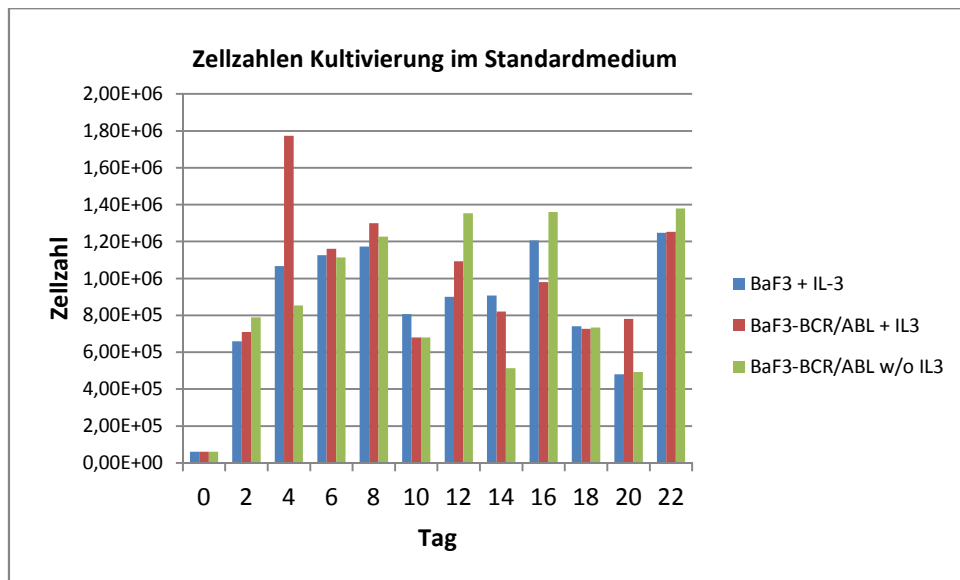
11 Anlagen

1. Darstellung weiterer Messergebnisse der LC-MS/MS





2. Darstellung Zellzahlen der Langzeitkultivierung



12 Selbständigkeitserklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen und, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ines Engelmann, geb. Grasenack
Geburtsdatum: 21.11.1989
Geburtstort: Lutherstadt Wittenberg

Schulbildung

1996-2000 Grundschule Friedrich-Engels
200-2002 Sekundarschule Karl-Marx
2002 – 2008 Lucas-Cranach-Gymnasium Lutherstadt Wittenberg
Abschluss: Abitur (1,0)

Studium

Seit Oktober 2008 Universität Leipzig
Studienfach: Medizin
Bisherige Abschlüsse: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2,0)

Praktika

Feb/Mär 2011 Universität Leipzig, Tropenmedizinischer Lehrgang
Feb 2012 Universität Leipzig, Famulatur in Gastroenterologie
Sept 2012 Korle Bu Teaching Hospital Accra, Famulatur in Kinderchirurgie
Feb 2013 Leipzig, Praxisfamulaturen in Kinderheilkunde und Rheumatologie
Aug - Dez 2013 Spitalzentrum Oberwallis, Standort Visp
1. Tertial des Praktischen Jahres in der Chirurgie
Dez – Apr 2013/14 St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig
2. Tertial des Praktischen Jahres in der Inneren Medizin
Seit Apr 2014 Parkkrankenhaus Leipzig
3. Tertial des Praktischen Jahres in der Anästhesie

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. med. habil. T. Lange, PhD M. Cross und Dr. rer. nat. E. Bach für die sehr gute Betreuung der Arbeit danken. Mit ihrer Motivation und Unterstützung haben sie einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet.

Mein weiterer Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mich während der Arbeit immer wieder motiviert und bei Problemen ausgeholfen haben.